



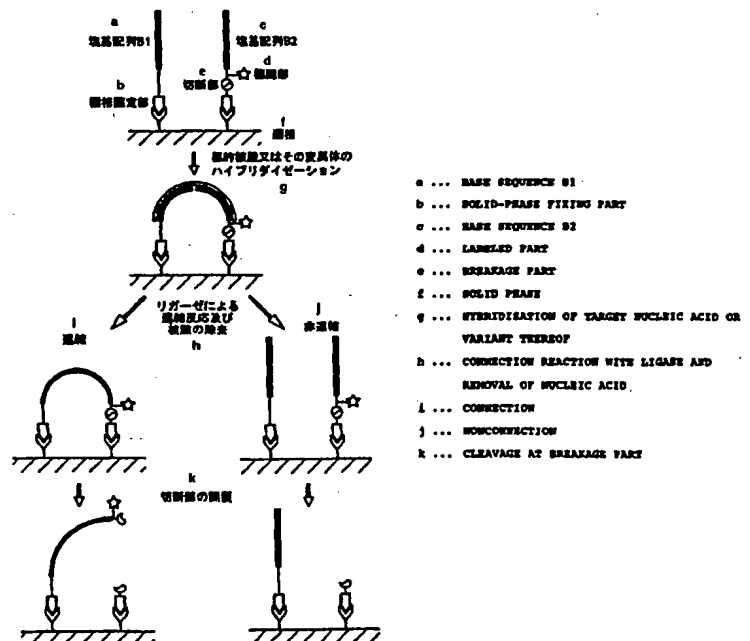
(51) 国際特許分類 C12Q 1/68	A1	(11) 国際公開番号 WO99/35287  (43) 国際公開日 1999年7月15日(15.07.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/00041 (22) 国際出願日 1999年1月8日(08.01.99) (30) 優先権データ 特願平10/2482 1998年1月8日(08.01.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 分子バイオホトニクス研究所(LABORATORY OF MOLECULAR BIOPHOTONICS)[JP/JP] 〒434-8555 静岡県浜北市平口5000番地 Shizuoka, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 阿部 聡(ABE, Satoshi)[JP/JP] 〒434-8555 静岡県浜北市平口5000番地 株式会社 分子バイオホトニクス研究所内 Shizuoka, (JP) 小玉啓文(KODAMA, Hirofumi)[JP/JP] 〒410-1123 静岡県裾野市伊豆島田78 Shizuoka, (JP) (74) 代理人 弁理士 長谷川芳樹, 外(HASEGAWA, Yoshiki et al.) 〒104-0031 東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショナルビル6F 創英国際特許事務所 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書 請求の範囲の補正の期限前の公開; 補正書受領の際には再公開される。

(54) Title: PROBES FOR DETECTING TARGET NUCLEIC ACID, METHOD OF DETECTING TARGET NUCLEIC ACID, AND SOLID PHASE FOR DETECTING TARGET NUCLEIC ACID AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称 標的核酸検出プローブ、標的核酸検出方法、標的核酸検出固相及びその製造方法

(57) Abstract

A pair of probes for detecting a target nucleic acid having two specific successive base sequences A1 and A2 which consists of: a probe (1) having a base sequence B1 which is complementary to A1 and in which (a) the 5' end has been phosphorylated and (b) the 3' end has been connected to a first solid-phase fixing part; and a probe (2) having a base sequence B2 which is complementary to A2 and in which (a) the 5' end has been connected to one end of a breakage part and (b) the other end of the breakage part has been connected to a second solid-phase fixing part. The target nucleic acid can be detected by hybridizing the nucleic acid on the solid phase having the probes fixed on a surface thereof, bonding the probes (1 and 2) thereto through a ligase reaction, subsequently cutting the breakage part, removing the hybridized target nucleic acid, and confirming the presence of the probe (2) bonded to the solid phase. Thus, the target nucleic acid can be detected with high sensitivity and high recognition.



(57)要約

本発明は、(1) 標的核酸の連続する2つの特定の塩基配列 A 1 A 2 のうちの A 1 と相補的な塩基配列 B 1 を有し、(a) 前記塩基配列 B 1 の 5' 末端がリン酸化され、(b) 前記塩基配列 B 1 の 3' 末端に第1の固相固定部が結合された、プローブ 1 と、(2) 前記塩基配列 A 1 A 2 のうちの A 2 と相補的な塩基配列 B 2 を有し、(a) 前記塩基配列 B 2 の 5' 末端が切断部の1端と結合され、かつ(b) 前記切断部の他端に第2の固相固定部が結合された、プローブ 2 とからなる、1組の標的核酸検出プローブにかかるものである。該プローブを表面上に固定した本発明にかかる固相上で標的核酸をハイブリダイズさせ、リガーゼ反応によりプローブ 1 及び 2 を結合させた後、該切断部を切断し、ハイブリッド体の標的核酸を除去して、固相上に結合したプローブ 2 の存在を確認することにより、標的核酸の存在を高感度、高認識で検出することが可能となる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SG シンガポール
AL アルバニア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SI スロヴェニア
AM アルメニア	FR フランス	LR リベリア	SK スロヴァキア
AT オーストリア	GA ガボン	LS レソト	SL シェラ・レオネ
AU オーストラリア	GB 英国	LT リトアニア	SN セネガル
AZ アゼルバイジャン	GD グレナダ	LU ルクセンブルグ	SZ スワジランド
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE グルジア	LV ラトヴィア	TD チャード
BB バルバドス	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴ
BE ベルギー	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BF ブルキナ・ファソ	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BG ブルガリア	GW ギニア・ビサウ	MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR トルコ
BJ ベナン	GR ギリシャ	共和国	TT トリニダード・トバゴ
BR ブラジル	HR クロアチア	ML マリ	UA ウクライナ
BY ベラルーシ	HU ハンガリー	MN モンゴル	UG ウガンダ
CA カナダ	ID インドネシア	MR モーリタニア	US 米国
CF 中央アフリカ	IE アイルランド	MW マラウイ	UZ ウズベキスタン
CG コンゴ	IL イスラエル	MX メキシコ	VN ヴェトナム
CH スイス	IN インド	NE ニジェール	YU ユーゴスラビア
CI コートジボアール	IS アイスランド	NL オランダ	ZA 南アフリカ共和国
CM カメルーン	IT イタリア	NO ノルウェー	ZW ジンバブエ
CN 中国	JP 日本	NZ ニュージーランド	
CU キューバ	KE ケニア	PL ポーランド	
CY キプロス	KG キルギスタン	PT ポルトガル	
CZ チェッコ	KR 韓国	RO ルーマニア	
DE ドイツ	KZ カザフスタン	RU ロシア	
DK デンマーク	LC セントルシア	SD スーダン	
EE エストニア		SE スウェーデン	

## 明細書

標的核酸検出プローブ、標的核酸検出方法、標的核酸検出固相及びその製造方法

### 技術分野

- 5       本発明は、特定のポリヌクレオチド配列を有する標的核酸を検出するプローブ、その検出固相、その固相の製造方法及び特定のポリヌクレオチド配列を有する標的核酸の検出方法に関する。

### 背景技術

- 10       近年の研究の進展により、種々の生物情報が遺伝子の配列から得ることが出来るようになった。それに伴い当該遺伝子を検出（標的核酸中の特定のポリヌクレオチド配列に対応する）することにより、医療分野においては疾病の存在、薬物に対する感受性、臓器移植の適合性などを診断することが、食品分野においては食中毒の原因になる様々な病原体を検出したり同定することが可能になった。
- 15       このような特定のポリヌクレオチド配列（又は塩基配列）を検出するためには、従来から、検出される塩基配列と相補的な配列を有するプローブであってラベル化されたものを用いてハイブリッド体を形成する方法（ハイブリダイゼーション法）が行われている。検出される塩基配列は目的に応じて多岐にわたるので、検出には目的に応じた種々の塩基配列のプローブが用いられている。
- 20       しかしながら、係るハイブリダイゼーション法に共通する問題として、塩基配列の認識能が低いことが指摘されている。すなわち、ハイブリダイゼーションに基づく核酸相互作用は配列間に多少のミスマッチがあっても十分起こり得ることから、厳密に特定の塩基配列を有する核酸のみを検出する方法としては不十分である。

25

### 発明の開示

本発明は、以上の問題点を解決し、高い認識能を有し、簡便迅速に標的核酸を検出するための標的核酸検出プローブ、及び標的核酸検出固相とその製造方法、さらに標的核酸検出方法を提供することにある。

本発明者は上記従来のハイブリダイゼーション法の持つ欠点に鑑み鋭意研究し、  
5 新規な構造を有する標的核酸検出プローブ、及び係るプローブを固相上に固定した標的核酸検出固相を見出すことに成功し、さらに係るプローブ又は固相を用いる標的核酸検出法を開発することに成功し本発明を完成したものである。

すなわち、本発明は、以下に示す1. から8. の標的核酸検出プローブを提供するものである。

10 1. (1) 標的核酸の連続する2つの特定の塩基配列A 1 A 2のうちのA 1と相補的な塩基配列B 1を有し、

(a)前記塩基配列B 1の5'末端がリン酸化され、

(b)前記塩基配列B 1の3'末端に第1の固相固定部が結合された、  
プローブ1と、

15 (2) 前記塩基配列A 1 A 2のうちのA 2と相補的な塩基配列B 2を有し、

(a)前記塩基配列B 2の5'末端が切断部の1端と結合され、かつ

(b)前記切断部の他端に第2の固相固定部が結合された、  
プローブ2とからなる、

1組の標的核酸検出プローブ。

20 2. (1) 標的核酸の連続する2つの特定の塩基配列A 1 A 2のうちのA 1と相補的な塩基配列B 1を有し、

(a)前記塩基配列B 1の5'末端がリン酸化され、

(b)前記塩基配列B 1の3'末端が切断部の1端と結合され、かつ

(c)前記切断部の他端に第1の固相固定部が結合された、

25 プローブ1と、

(2) 前記塩基配列A 1 A 2のうちのA 2と相補的な塩基配列B 2を有し、

前記塩基配列 B 2 の 5' 末端に第 2 の固相固定部が結合された、  
プローブ 2 とからなる、  
1 組の標的核酸検出プローブ。

3. 上記 1. に記載の標的核酸検出プローブであって、

5 (a) 前記プローブ 2 が、前記固相固定部と前記切断部の間に、さらにスペーサーを有すること、又は

(b) 前記プローブ 1 が、前記固相固定部と前記塩基配列 B 1 の 3' 末端の間に、さらにスペーサーを有することを特徴とする標的核酸検出プローブ。

4. 上記 2. に記載の標的核酸検出プローブであって、

10 (a) 前記プローブ 1 が、前記固相固定部と前記切断部の間に、さらにスペーサーを有すること、又は

(b) 前記プローブ 2 が、前記固相固定部と前記塩基配列 B 2 の 5' 末端の間に、さらにスペーサーを有することを特徴とする標的核酸検出プローブ。

5. 上記 1. 又は 3. いずれかに記載の標的核酸検出プローブであって、

15 前記プローブ 2 が、前記塩基配列 B 2 の 5' 末端と前記切断部の間にさらに標識部を有することを特徴とする標的核酸検出プローブ。ここで前記標識部が設けられる位置は、前記塩基配列 B 2 の 5' 末端と前記切断部の間に限定されず、前記塩基配列 B 2 内においても種々の結合形式により設けることを含むものである  
(以下、13.、21. において同じ)。

20 6. 上記 2. 又は 4. のいずれかに記載の標的核酸検出プローブであって、  
前記プローブ 1 が、前記塩基配列 B 1 の 3' 末端と前記切断部の間にさらに標識部を有することを特徴とする標的核酸検出プローブ。ここで前記標識部が設けられる位置は、前記塩基配列 B 1 の 3' 末端と前記切断部の間に限定されず、前記塩基配列 B 1 内においても種々の結合形式により設けることを含むものである  
25 (以下、14.、22. において同じ)。

7. 上記 1. から 6. のいずれか 1 項に記載の標的核酸検出プローブであっ

て、前記切断部が、ジスルフィド結合を有することを特徴とする標的核酸検出プローブ。

8. 上記5. 又は6. のいずれかに記載の標的核酸検出プローブであって、前記標識部が、ジゴキシゲニンを有することを特徴とする標的核酸検出プローブ。

5        また、本発明は、以下9. から16. に示す標的核酸検出固相を提供するものである。

9. (1) 標的核酸の連続する2つの特定の塩基配列A1A2のうちのA1と相補的な塩基配列B1を有し、

(a)前記塩基配列B1の5'末端がリン酸化され、

10        (b)前記塩基配列B1の3'末端に第1の固相固定部が結合されたプローブ1が、

前記第1の固相固定部により表面に固定され、

(2) 前記塩基配列A1A2のうちのA2と相補的な塩基配列B2を有し、

(a)前記塩基配列B2の5'末端が切断部の1端と結合され、かつ

15        (b)前記切断部の他端に第2の固相固定部が結合されたプローブ2が、  
前記第2の固相固定部により表面に固定された、  
標的核酸検出固相。

10. (1) 標的核酸の連続する2つの特定の塩基配列A1A2のうちのA1と相補的な塩基配列B1を有し、

20        (a)前記塩基配列B1の5'末端がリン酸化され、

(b)前記塩基配列B1の3'末端が切断部の1端と結合され、かつ

(c)前記切断部の他端に第1の固相固定部が結合されたプローブ1が、

前記第1の固相固定部により表面に固定され、

(2) 前記塩基配列A1A2のうちのA2と相補的な塩基配列B2を有し、

25        前記塩基配列B2の5'末端に第2の固相固定部が結合されたプローブ2が、  
前記第2の固相固定部により表面に固定された、

標的核酸検出固相。

1 1. 上記 9. に記載の標的核酸検出固相であって、

(a) 前記プローブ 2 が、前記第 2 の固相固定部と前記切断部の間に、さらにスペーサーを有すること、又は

5 (b) 前記プローブ 1 が、前記第 1 の固相固定部と前記塩基配列 B 1 の 3' 末端の間に、さらにスペーサーを有することを特徴とする標的核酸検出固相。

1 2. 上記 1 0. に記載の標的核酸検出固相であって、

(a) 前記プローブ 1 が、前記第 1 の固相固定部と前記切断部の間に、さらにスペーサーを有すること、又は

10 (b) 前記プローブ 2 が、前記第 2 の固相固定部と前記塩基配列 B 2 の 5' 末端の間に、さらにスペーサーを有することを特徴とする標的核酸検出固相。

1 3. 上記 9. 又は 1 1. のいずれかに記載の標的核酸検出固相であって、前記プローブ 2 が、前記塩基配列 B 2 の 5' 末端と前記切断部の間にさらに標識部を有することを特徴とする標的核酸検出固相。

15 1 4. 上記 1 0. 又は 1 2. のいずれかに記載の標的核酸検出固相であって、前記プローブ 1 が、前記塩基配列 B 1 の 3' 末端と前記切断部の間にさらに標識部を有することを特徴とする標的核酸検出固相。

1 5. 上記 9. から 1 4. のいずれか 1 項に記載の標的核酸検出固相であって、

20 前記切断部が、ジスルフィド結合を有することを特徴とする標的核酸検出固相。

1 6. 上記 1 3. 又は 1 4. のいずれか 1 項に記載の標的核酸検出固相であって、前記標識部が、ジゴキシゲニンでラベル化されていることを特徴とする標的核酸検出固相。

さらに、本発明は、以下 1 7. から 2 5. に示す標的核酸検出方法を提供する  
25 ものである。

1 7. (A) (1) 標的核酸の連続する 2 つの特定の塩基配列 A 1 A 2 のうちの

A 1 と相補的な塩基配列 B 1 を有し、

(a)前記塩基配列 B 1 の 5' 末端がリン酸化され、

(b)前記塩基配列 B 1 の 3' 末端に第 1 の固相固定部が結合された、

プローブ 1 を前記第 1 の固相固定部で固相表面に固定し、

5 (2) 前記塩基配列 A 1 A 2 のうちの A 2 と相補的な塩基配列 B 2 を有し、

(a)前記塩基配列 B 2 の 5' 末端が切断部の 1 端と結合され、かつ

(b)前記切断部の他端に第 2 の固相固定部が結合された、

プローブ 2 を前記第 2 の固相固定部で固相表面に固定する第 1 の工程と、

10 (B) 前記プローブ 1 と、前記プローブ 2 と、前記標的核酸とをハイブリダイズしてハイブリッド体を形成する第 2 の工程と、

(C) 前記ハイブリッド体の前記プローブ 1 と前記プローブ 2 とをリガーゼ反応により結合する第 3 の工程と、

(D) 前記プローブ 2 の切断部を切断反応により切断する第 4 の工程と、

15 (E) 前記第 3 の工程により形成される、前記プローブ 2 の塩基配列 B 2 と前記切断部を結合した前記プローブ 1 を検出する第 5 の工程とを、含むことを特徴とする標的核酸検出方法。

18. (A) (1) 標的核酸の連続する 2 つの特定の塩基配列 A 1 A 2 のうちの A 1 と相補的な塩基配列 B 1 を有し、

(a)前記塩基配列 B 1 の 5' 末端がリン酸化され、

20 (b)前記塩基配列 B 1 の 3' 末端に切断部が結合され、かつ

(c)前記切断部の他端に第 1 の固相固定部が結合されたプローブ 1 を前記第 1 の固相固定部で固相表面に固定し、

(2) 前記塩基配列 A 1 A 2 のうちの A 2 と相補的な塩基配列 B 2 を有し、

25 前記塩基配列 B 2 の 5' 末端に第 2 の固相固定部が結合されたプローブ 2 を前記第 2 の固相固定部で固相表面に固定する第 1 の工程と、

(B) 前記プローブ 1 と、前記プローブ 2 と、前記標的核酸とをハイブリダイズ



してハイブリッド体を形成する第2の工程と、

(C) 前記ハイブリッド体の前記プローブ1と前記プローブ2とをリガーゼ反応により結合する第3の工程と、

(D) 前記プローブ1の切断部を切断反応により切断する第4の工程と、

5 (E) 前記第3の工程により形成される、前記プローブ1の塩基配列B1と前記切断部を結合した前記プローブ2を検出する第5の工程とを、含むことを特徴とする標的核酸検出方法。

19. 上記17.に記載の標的核酸検出方法であって、

10 (a) 前記プローブ2が、前記第2の固相固定部と前記切断部の間に、さらにスペーサーを有すること、又は

(b) 前記プローブ1が、前記第1の固相固定部と前記塩基配列B1の3'末端の間に、さらにスペーサーを有することを特徴とする標的核酸検出方法。

20. 上記18.に記載の標的核酸検出方法であって、

15 (a) 前記プローブ1が、前記第1の固相固定部と前記切断部の間に、さらにスペーサーを有すること、又は

(b) 前記プローブ2が、前記第2の固相固定部と前記塩基配列B2の5'末端の間に、さらにスペーサーを有することを特徴とする標的核酸検出方法。

21. 上記17.又は19.のいずれかに記載の標的核酸検出方法であって、前記プローブ2が、前記塩基配列B2の5'末端と前記切断部の間にさらに標識部を有し、前記標識部を検出することを特徴とする標的核酸検出方法。

22. 上記18.又は20.のいずれかに記載の標的核酸検出方法であって、前記プローブ1が、前記塩基配列B1の3'末端と前記切断部の間にさらに標識部を有し、前記標識部を検出することを特徴とする標的核酸検出方法。

23. 上記17.から22.のいずれか1項に記載の標的核酸検出方法であって、前記切断部が、ジスルフィド結合を有し、かつ前記第4の工程においてジスルフィド結合を還元剤により切断することを特徴とする標的核酸検出方法。

24. 上記17. から23. のいずれか1項に記載の標的核酸検出方法であって、前記第5の工程において、固相に結合しているプローブの質量を表面プラズモン共鳴法により検出することを特徴とする標的核酸検出方法（ここで、プローブの質量は、プローブ1又はプローブ2の有無を示す）。

5      25. 上記21. 又は22. のいずれか1項に記載の標的核酸検出方法であって、前記標識部が、ジゴキシゲニンでラベル化されていることを特徴とし、前記第5の工程において、ジゴキシゲニンを検出することを特徴とする標的核酸検出方法。

10      さらに、本発明は、以下26. から28. に示す標的核酸検出固相の製造方法を提供するものである。

26. (A) (1) 標的核酸の連続する2つの特定の塩基配列A1A2と、  
(2) 標的核酸の連続する2つの特定の塩基配列A1A2のうちのA1と相補的な塩基配列B1を有し、

15      (a)前記塩基配列B1の5'末端がリン酸化され、  
    (b)前記塩基配列B1の3'末端に第1の固相固定部が結合された、  
    プローブ1と、  
(3) 前記塩基配列A1A2のうちのA2と相補的な塩基配列B2を有し、  
    (a)前記塩基配列B2の5'末端が切断部の1端と結合され、かつ  
    (b)前記切断部の他端に第2の固相固定部が結合された、  
20      プローブ2とを、

ハイブリダイズしてハイブリッド体を形成する第1の工程と、

(B) 前記ハイブリッド体を、前記第1の固相固定部および前記第2の固相固定部で、固相表面に固定する第2の工程と、

25      (C) 前記ハイブリッド体から前記標的核酸を除去する第3の工程とを、  
有する標的核酸検出固相の製造方法。

27. (A) (1) 標的核酸の連続する2つの特定の塩基配列A1A2と、

(2) 標的核酸の連続する2つの特定の塩基配列A1A2のうちのA1と相補的な塩基配列B1を有し、

(a)前記塩基配列B1の5'末端がリン酸化され、

(b)前記塩基配列B1の3'末端が切断部の1端と結合され、かつ

5 (c)前記切断部の他端に第1の固相固定部が結合された、

プローブ1と、

(3) 前記塩基配列A1A2のうちのA2と相補的な塩基配列B2を有し、

前記塩基配列B2の5'末端に第2の固相固定部が結合された、

プローブ2とを、

10 ハイブリダイズしてハイブリッド体を形成する第1の工程と、

(B) 前記ハイブリッド体を、前記第1の固相固定部および前記第2の固相固定部で、固相表面に固定する第2の工程と、

(C) 前記ハイブリッド体から前記標的核酸を除去する第3の工程とを、

有する標的核酸検出固相の製造方法。

15 28. 上記26. 又は27. において、前記プローブ1又は2が、さらにスパーサー又は標識部、又はその両方を含む標的核酸検出固相の製造方法。

以下、本発明を、実施の形態に即してより詳しく説明する。

#### 図面の簡単な説明

20 図1は、本発明に係る標的核酸検出プローブの一例を示す図である。

図2は、本発明に係る標的核酸検出プローブの一例を示す図である。

図3は、本発明に係る核酸検出固相の製造方法の一例を示す図である。

図4は、本発明に係る標的核酸検出方法の一例を示す図である。

図5は、本発明に係る標的核酸検出方法の一例を示す図である。

25 図6は、本発明に係る標的核酸検出プローブの切断部一例を示す図である。

図7は、本発明に係る標的核酸検出プローブの切断部一例を示す図である。

図 8A は、実施例(12)で示される本発明に係る標的核酸検出方法の一態様である直接蛍光検出法を示す模式図である。

図 8B は、実施例(13)で示される本発明に係る標的核酸検出方法の一態様である直接蛍光検出法を示す模式図である。

5 図 9 は、実施例(10)で示される本発明に係る標的核酸検出方法の一態様であるジゴキシゲニン-蛍光抗体法を示す模式図である。

図 10 は、実施例(11)で示される本発明に係る標的核酸検出方法の一態様である示すジゴキシゲニン-酵素抗体法（蛍光）を示す模式図である。

10 図 11 は、実施例(14)で示される本発明に係る標的核酸検出方法の一態様である示すジゴキシゲニン-酵素抗体法（化学発光）を示す模式図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

15 本発明に係る標的核酸検出プローブは、1組2種類のプローブ（以下プローブ1およびプローブ2とする）からなるものである。また、本発明に係る標的核酸検出固相は、上記本発明に係る2種類のプローブを固相表面上に適当な空間配置を保持して固定されたものである。さらに、本発明に係る標的核酸検出方法は係る標的核酸検出固相を用いて、標的核酸を高感度・高認識で検出するものである。さらに、本発明に係る標的核酸検出固相の製造方法は、係る標的核酸検出固相を製造する方法である。

20 本発明に係るプローブ1およびプローブ2の具体的な構造を図1（タイプ1とする）および図2（タイプ2とする）にそれぞれ示した。図1と2で示されたプローブの構造上の違いは、以下に説明する切断部（又はさらに標識部）を、プローブ1に導入するか、又はプローブ2に導入するかの違いである。従って、図1に示されるタイプ1では、プローブ2の塩基配列B2の5'末端に切断部（又はさらに標識部）が結合している。一方、図2に示されるタイプ2では、プローブ1の塩基配列B1の3'末端に切断部（又はさらに標識部）が結合している。

25

図1、2にはさらに、検出されるべき標的核酸であって、特定の連続する塩基配列A1A2を有する核酸を模式的に示した。タイプ1およびタイプ2のプロープ1とプロープ2は共に、A1A2と連続してハイブリダイズ可能な塩基配列(B1, B2)をそれぞれ有するものである。さらにリガーゼ反応によりこれらのプロープが結合されるように、プロープ1の5'末端はリン酸化されている(図ではPで表されている)。

なお、タイプ1とタイプ2は、標的核酸の検出における操作、検出方法、得られる結果に本質的な違いはなく、以下の説明では、主にタイプ1(図1)のプロープ1、2について説明する。

プロープ1およびプロープ2は、適当な固相表面に固定するための固相固定部を有する。係る固相固定部は、プロープ1及びプロープ2を、固相表面上に好ましい空間位置をとるように固定化可能とするものである。

さらに、プロープ1又はプロープ2は、必要ならば、上記のハイブリダイゼーション、リガーゼ反応、切断反応に影響されないスペーサーを有することが可能である。係るスペーサーは、本発明に係る固相上にプロープを固定化する反応や、以下説明する検出反応がより効率的に進行するために、主に固相表面からの距離を調整するために用いられるものである。

さらに、プロープ2は、適当な化学的、酵素的又は物理的手段により選択的に切断され得る基(以下切断部)を有するものである。

さらに、プロープ2は、必要ならば、以下説明する種々の検出方法との組合せを可能とするための標識部を有するものである。

また、図3には、本発明に係る標的核酸検出固相とその製造方法の好ましい一例を模式的に示した。係る方法により、固相上に固定化されたプロープ1およびプロープ2の空間位置は、標的核酸とプロープ1および2の安定なハイブリッド体を形成可能とする。

さらに、図4、図5には、本発明にかかる検出固相を用いて標的核酸の検出方

法の一例を模式的に示した。すなわち、上記標的核酸検出固相と標的核酸を混合すると、標的核酸はプローブ1、2と固相表面上で効率的にハイブリッド体を形成する。さらに、リガーゼ反応によりプローブ1と2を結合する。この際、リガーゼ反応の高認識性により、正しくハイブリッド体を形成しているプローブ1及び2のみが結合されることとなる。

図4では、この後、標的核酸をのぞくと、リガーゼ反応により結合したプローブは固相上で環状構造を示すこととなる。また、上記リガーゼ反応により結合しなかったプローブは固相上でもとの状態へと戻ることとなる。さらに、切断部を切断（開裂）する反応によりプローブ2は直接固相上からは遊離するが、この際、上記リガーゼ反応によりプローブ1に結合したプローブ2は溶液中には遊離しない。一方、上記リガーゼ反応によりプローブ1と結合しなかったプローブ2は溶液中に遊離して除かれることとなる。その結果、上記リガーゼ反応により連結されたプローブ2が固相上に残存することを検出することは、上記リガーゼ反応が生じていたことを意味し、すなわち、標的核酸が存在していたことを示すこととなる。また、図5には、本発明に係る検出固相を用いて標的核酸の検出方法の別の一例を模式的に示した。すなわち図4と同様にハイブリット体の形成とリガーゼ反応を行った後、まず切断部を切断する反応を行い、次に、標的核酸を除く操作をする方法を示した。この方法においても図4と同様に、上記リガーゼ反応によりプローブ1に結合したプローブ2は溶液中には遊離せず、上記リガーゼ反応によりプローブ1と結合しなかったプローブ2は溶液中に遊離して除かれることとなる。その結果、上記リガーゼ反応により結合されたプローブ2が固相上に残存することを検出することは、上記リガーゼ反応が生じていたことを意味し、すなわち標的核酸が存在していたことを示すこととなる。上記リガーゼ反応により連結されたプローブ2が固相上に残存することを検出する方法は、種々の方法が利用可能である。また、上記リガーゼ反応により連結されなかったプローブ2が固相上に残存しないことを検出することも可能であり、この場合は、上記リガー

ぜ反応が生じなかったことを意味し、標的核酸が存在しなかったことを示すこととなる。上記リガーゼ反応により連結されなかったプローブ2が残存しないことを検出する方法は、種々の方法が利用可能である。

以下本発明をより詳細に説明する。

5 (標的核酸)

本発明により検出可能な特定のポリヌクレオチド配列を有する核酸（標的核酸）の種類については、特に制限はされず、各種の核酸（DNA、RNA、オリゴヌクレオチド等）に適用可能である。また標的核酸の長さにおいても特に制限はなく目的に応じて標的核酸自体、又は適当な処理により適当な長さに調製した

10 ものにも使用可能である。

また本発明は、検出される標的核酸中の特定のポリヌクレオチド配列とハイブリダイズ可能な塩基配列を有する2種類のプローブを用いるものであり、従ってこの特定のポリヌクレオチド配列はあらかじめ知られている必要がある。

このあらかじめ知られている特定のポリヌクレオチド配列の塩基数については

15 特に制限はないが、(1)本発明に係るプローブと十分なハイブリダイゼーションが可能であり、かつ(2)以下で説明するリガーゼ反応によりプローブを結合するに十分な塩基数を有する必要がある。係る塩基数は、用いるプローブの種類および塩基数、また標的核酸の特定のポリヌクレオチド配列の種類および塩基数に依存するが、最適の塩基数を見出すことは当業者にとって容易である。

20 具体的には、少なくとも20塩基数あればよく、さらに好ましくは30塩基以上である。なお、あまりに塩基数が大きくなるとプローブの合成、取扱の困難性等から好ましくない。

またその特定のポリヌクレオチド配列の標的核酸中での位置についても特に制限はない。末端付近でも中間部分でもよい。

25 さらに、本発明に係る方法を使用する際には、本発明に係るプローブとハイブリダイズさせるために、少なくとも上記特定のポリヌクレオチド配列部分は1本

鎖である必要があるが、通常の公知の手段（熱またはアルカリ変性、低塩濃度処理等の方法）により容易に1本鎖とすることが可能である。

（標的核酸検出プローブ）

本発明に係るプローブは、図1（タイプ1）および図2（タイプ2）にいくつかの例が示されているように、1組の2種類のプローブ（プローブ1及びプローブ2とする）からなる。タイプ1について説明すれば、プローブ2は、少なくとも固相固定部と、標的認識部、及び切断部とを有する。またプローブ1は少なくとも固相固定部と、標的認識部とを有する。さらに必要な場合プローブ1又はプローブ2はスペーサーを有することも可能である。さらに、必要な場合、プローブ2に検出に用いる標識部を有する。

本発明に係るタイプ1のプローブ1、2は具体的には以下のようにその構造が構成され得る。

(i) 図1に示されるように、検出されるべき標的核酸の連続する特定の塩基配列A1A2を任意に決める。

(ii) 塩基配列A1及びA2に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドB1及びB2を決定し、それぞれプローブ1とプローブ2の塩基配列認識用の塩基配列とする。

(iii) プローブ1のB1の5'末端をリン酸化する。

(iv) プローブ1のB1の3'末端に、固相固定部を結合する。

(v) 必要な場合は、B1の3'末端と固相固定部間にさらにスペーサーを結合する。

(vi) プローブ2のB2の5'末端に切断部を介して固相固定部を結合する。

(vii) 必要な場合は、切断部と固相固定部間にさらにスペーサーを結合する。

(viii) 必要な場合は、前記切断部とB2の5'末端間にさらに標識部を結合する。

また、固相固定部は、固相表面上に該プローブを固定する基であれば特に制限



されない。本発明に係る標的核酸検出方法に使用する処理において該固定が保持されればよい。具体的には、通常の化学反応による結合基、種々の相互作用による結合基等が挙げられる。通常の化学反応による結合基には、固相表面の活性基（例えば水酸基、カルボン酸基、アミノ基等）と共有結合を形成可能な基を選択  
5 できる。具体的には、エステル、エーテル、アミド、チオアミド結合等が挙げられる。また、種々の相互作用としては、例えば蛋白質ーリガンド間の結合作用が挙げられる。具体的には、ビオチン／アビジン間相互作用が好ましく選択できる。この場合は、固相表面上にはアビジン（又はストレプトアビジン）をあらかじめ固定しておくことが好ましい。係る固相は通常の公知の方法により作製可能である。さらに、該固相固定部をプローブに導入する方法についても特に制限はなく、  
10 通常の結合反応を好ましく使用可能である。具体的にはホスホロアミダイト法が適用可能である。

プローブ 1、2 の標的核酸を認識する B 1、B 2 は、上記の標的核酸の特定のポリヌクレオチド配列部分と相補的な塩基配列を有するものであり、上記の特定の  
15 ポリヌクレオチド配列部分 A 1 A 2 と連続してハイブリダイズできるものである。それぞれのプローブの塩基配列の数には特に制限はないが、本発明においては、塩基配列数は約 10 以上、好ましくは 15 以上である。塩基数が少ない場合は十分な特異的認識作用がなく、またリガーゼ反応が困難となる。また、あまりに多いと取扱性、保存性などに問題を生じる。

また、本発明に係る切断部は、種々の適当な反応条件下（化学反応、酵素反応、物理化学反応）により選択的に切断可能な基であれば特に制限はない。係る選択  
20 は、切断反応の条件に、また切断反応の結果形成される切断部の基（同じ基である場合、相違する基である場合）に、さらに種々の標識部を利用する検出方法により可能である。上記切断反応の条件は特に制限はなく、通常の化学反応、光反  
25 応、または酵素反応等が選択可能である。

本発明において該切断部としてのいくつかの好ましい例を、以下図 6 の(A)～

(I)、図7とともに示した。

(A) 切断部がジスルフィド結合 ( $-S-S-$ ) の場合。

この場合は切断方法としては種々の還元剤が使用可能である点で好ましい。具体的にはジチオスレイトール(DTTとする)が挙げられる。

5 (B) 切断部が $-SO_2-$ 結合の場合。

この場合は切断方法としては種々の塩基性試薬が使用可能である点で好ましい。

(C)(D)(E) 切断部がアミド結合 (チオアミド結合も含む、図示せず)、エステル結合、エーテル結合の場合。

10 この場合は、種々の化学反応による切断、または光反応による切断、酵素反応 (例えばペプチダーゼ、エステラーゼ) による切断等が可能である。特にアミド結合、エステル結合の場合は加水分解が挙げられ、(E)のタイプのエーテル結合は光反応により容易に切断することが可能である。また、これら(C)(D)(E)のタイプの切断部は、該切断反応後に特有の切断端を一方に発生させることができるものである。従って、該切断反応の後、特定の切断端のみをさらに種々の反応によりラベル化し、検出に用いることが可能となる。

15 (F)(G)(H) 切断部が係る結合基を有する場合は、一般的に過酸化物により容易に切断することが可能である。過酸化物は有機過酸化物 (例えば過酢酸) 及び無機過酸化物 (例えば過酸化水素) を含む。

20 (I) 切断部が係る結合基を有する場合は、ヒドロキシルアミンで容易に切断可能である。

さらにその他の例を具体的に説明する (図示せず)。

(i) 切断部がRNA配列の場合。

この場合、標的核酸の認識部がRNA配列以外、例えばDNA配列であることが必須である。係る場合は、リボヌクレアーゼによる切断が可能である。

25 (ii) 切断部がDNA配列の場合。

この場合、標的核酸の認識部がDNA配列以外、例えばRNA配列であることが必

須である。係る場合は、デオキシリボヌクレアーゼによる切断が可能である。

(iii) 切断部が炭水化物ポリマーである場合。

この場合は、種々のグリコシダーゼによる切断が可能である。

(iv) 切断部がデオキシウリジンである場合。

- 5        図7には、切断部がデオキシウリジンである場合の切断方法を示した。つまり、  
ウラシル DNA グリコシダーゼ (DNA 修復酵素の一つ、DNA 複製過程 での dUTP の  
取り込みあるいはシトシンの脱アミノ化によって生じた 1 本鎖あるいは 2 本鎖  
DNA からウラシルを除去する反応を触媒) 処理に引き続いてアルカリ条件での加  
熱により切断 (一方をアルデヒド、他方をリン酸とする切断端を生成) が可能で  
10        ある。

- 本発明に係る標識部は、上記プローブに検出手段との組合せに適当なラベル基  
が導入されたものであり、切断反応後に係るラベル基が固相上に存在するか (又  
は存在しないか) を検出可能とするためのものである。従って、該ラベル基は特  
に限定されず係る目的を達成する種々の種類の基を選択利用可能である。係る標  
15        識部の導入方法についても特に制限はなく通常公知の核酸へのラベル化方法が容  
易に適当可能である。

- 具体的には、(i) 抗原抗体反応を利用するものとして、ジゴキシゲニンのラベ  
ル化が挙げられる。係るジゴキシゲニンによるラベル化には通常使用される方法  
が可能である。また、(ii) 蛍光を利用するものとして、蛍光色素 (例えば  
20        BODIPY493/503、Rhodamine Red あるいは TEXAS Red) や、蛍光ビーズによるラベ  
ル化が挙げられる。蛍光色素によるラベル化には、プローブ合成の際に使用する  
オリゴヌクレオチドにあらかじめ導入したアミノ基に蛍光色素のスクシンイミド  
エステル誘導体を反応させることで容易に導入可能であり、市販のキットがこの  
目的で利用可能である。また、蛍光ビーズによるラベル化は、該蛍光ビーズをプ  
25        ロープと化学的に結合させることにより可能となる。さらに、(iii) ラジオアイ  
ソトープによるラベル化が挙げられる。例えば、リガーゼ反応用にリン酸基が導

入されたプローブの合成において、 $^{32}\text{P}$ を用いることでプローブをラジオアイソトープ標識することが可能である。

また、上で説明した切断部が切断された後互いに相違する基を形成する場合(例えば、図6の(C)(D)(E)のタイプの切断部)は、切断端の化学的性質に基づいて切断後にさらに、選択的に検出用の標識(ラベル基)を導入することも可能である。

必要な場合、それぞれのプローブには以下で説明するスペーサーをさらに設けることが可能である。係るスペーサーを設けることで、ハイブリダイゼーションの効率化、又は以上で説明した種々の切断部での切断反応、さらに本発明において使用可能な種々の検出方法等を最適化、効率化を図ることが可能となる。具体的には、固相固定部と切断部の間に適度な長さのスペーサーを導入することで切断部での切断反応を効率よく行うことが可能となる。また、プローブ1の固相固定部と塩基配列B1の間、又はプローブ2の固相固定部と切断部の間、あるいはその両方にスペーサーを設けることで、標的核酸の塩基配列A1A2とハイブリダイズ可能なプローブ1及びプローブ2の塩基配列B1及びB2が固相表面より離れることにより、標的核酸の塩基配列B1及びB2へのハイブリダイゼーションの効率化を図ることが可能となる。

ここで好ましく使用可能なスペーサーの種類、形状等には特に制限はない。上記2種類のプローブと標的核酸をハイブリダイズする条件、それに伴う洗浄操作、さらに該標的核酸を除去する操作等において充分強固な結合性を有していればよい。具体的には、オリゴヌクレオチド、オリゴペプチド、アルキレン鎖等が挙げられる。特にオリゴチミジンが好ましく使用でき、必要な長さはチミジンの数により容易に得ることができる。また、適当な数の炭素数を有するアルキレン鎖も好ましく使用可能である。係るスペーサーを導入する方法においても特に制限はなく種々の公知の結合反応が利用可能である。具体的には、通常のオリゴヌクレオチド合成のホスホロアミダイト法を利用して容易に実施可能である。

### (検出固相)

本発明において検出固相とは、固相媒体であって、その表面上に、上記説明した 2 種類のプローブが隣接して結合されたものである。その結合の密度等については特に制限はなく、種々の密度で結合されたものが使用可能である。さらに、  
5 固相媒体の種類についても制限はなく、例えば、無機物質固相媒体、または有機物質固相媒体等使用可能である。無機物質固相媒体には、具体的には種々の金属膜（例えば表面プラズモン共鳴装置で使用されるセンサーチップ）、シリカゲル、アルミナ、ガラス、石英等が挙げられる。有機物質固相媒体には、ニトロセルロース膜、ナイロン膜、ポリスチレン、ポリエチレンなどのプラスチック系材料等  
10 が挙げられる。また、これらの表面にカルボキシメチルデキストランなどを結合したものをを用いることも可能である。本発明においては特にポリスチレン系のタイタプレートや石英ガラスの使用が好ましい。

### (検出用固相製造方法)

本発明に係る検出用固相は、2 種類のプローブが特定の空間配置を有するように固相上に固定されたものである。すなわち、上記プローブが標的核酸の特定の  
15 ポリヌクレオチド配列と連続してハイブリダイズし、さらに、酵素反応により連結され得る空間配置である。

上記の特定の空間配置にプローブを固定して検出用固相を製造する方法には、例えば、上記 2 種類のプローブが好ましい濃度になるようにあらかじめ混合し、  
20 その混合物を検出用固相表面と反応させ、固相固定部で結合する方法がある。この場合、2 種類のプローブは上記固相表面にランダムに結合したものが得られる。この場合においては、上記 2 種類のプローブの空間配置のうち、標的核酸の特定のポリヌクレオチド配列と連続してハイブリダイズし、さらに、酵素反応により連結され得る空間配置をとるものは極めて少数であると考えられる。

25 本発明においては、好ましい空間配置にある 1 組のプローブをより多く固相上に固定するための方法として、以下の手段が好ましく使用可能である（図 3）。

すなわち、2種類のプローブをまず標的核酸と混合してハイブリダイズさせる。得られたハイブリッド体を検出用固相上で結合反応させ、ハイブリッド体を固定する。上記固相を充分洗浄後、ハイブリッド体から標的核酸を熱、またはアルカリ処理等で除去する。係る操作により、2種類のプローブがそれらの空間配置が

5 標的核酸とハイブリダイズするに好ましいように、固相上に固定されることとなる。

(ハイブリダイズの条件)

本発明において、本発明に係る1組のプローブと標的核酸とのハイブリダイズ条件は特に制限なく通常の条件を使用可能である。例えば、「分子生物学実験マ

10 ニュアル」(川上正也監修；講談社)172ページに記載の方法に準じて、または修正して使用できる。また、形成されるハイブリッド体から標的核酸を除き、1本鎖にする条件は特に制限はなく、通常公知の条件が好ましく使用可能である。例えば、アルカリ処理、または熱処理、酸処理等である。

(酵素)

本発明においては、1組の2種類のプローブを結合するに用いることができる酵素は例えば、リガーゼが挙げられる。リガーゼの種類および反応条件については、特に制限はなく通常の見方に基づいて種々の公知のリガーゼ反応を使用可能である。例えばT4 DNA リガーゼ(宝酒造製)、Ampligase (EPICENTRE TECHNOLOGIES

15 製)、Pfu DNA リガーゼ (STRATAGENE 製) が好ましく使用可能である。

さらに、リガーゼ反応に基づく連結後は、種々の操作(例えば、熱処理、アルカリ処理、酸処理等)に基づき、標的核酸を除去することが可能である。

(検出方法)

本発明に係る標的核酸の検出方法は、本発明に係る検出固相を用いるものであって、前記検出固相上の1組のプローブが標的核酸の特定のポリヌクレオチド配

25 列と連続してハイブリダイズさせ、得られるハイブリッド体にリガーゼ反応により上記2種類のプローブ間を結合して得られる連結体形成を利用するものである。

標的核酸の塩基配列が異なり、プローブが誤認識した場合には、リガーゼ反応によって上記連結体の形成は生じないこととなり、アルカリ処理等で標的核酸を除いた後は、上記プローブ同士が連結されず、それぞれの末端部が存在することとなり、1組のプローブは最初の状態に戻るることとなる。

- 5       本発明はさらに、アルカリ処理等で標的核酸を除いた後、プローブの切断部の開裂反応を利用するものである。すなわち、上記連結体を形成した場合は、係る開裂反応により本発明に係る1組のプローブが連結された状態で固相上に残存することとなる。一方、標的核酸の塩基配列が異なり、プローブが誤認識した場合には、リガーゼ反応によって上記連結体の形成は生じず、アルカリ処理等で標的核酸を除いた後は、本発明に係る1組のプローブは最初の状態に戻るることとなるので、切断部の開裂反応により本発明に係る1組のプローブの一方は溶液中に遊離し、固相上には存在しないこととなる。
- 10

- 本発明に係る標的核酸検出方法において、同様な操作はリガーゼ反応の後に、まずプローブの切断部の開裂反応を行い、次に続いてアルカリ処理等で標的核酸の除去を行っても行うことができる。この場合も同様に、リガーゼ反応により連結体を形成した場合には1組のプローブが連結された状態で固相上に残存することになり、また標的核酸の塩基配列が異なり、プローブが誤認識した場合には、本発明に係る1組のプローブの一方は溶液中に遊離し、固相上に存在しないこととなる。
- 15

- 20       従って、本発明は、上記開裂反応後の固相上に存在するプローブを検出することにより、上記リガーゼ反応が起ったか否かを知り、その結果により標的核酸が存在するか否かを判別することを可能とするものである。

- 本発明において使用するリガーゼ反応は極めて高い塩基特異性を有していることが知られており、本発明に係る方法において誤認識（ミスマッチ）の程度を極めて低いレベルとすることが可能となるものである。
- 25

      本発明に係る、上記開裂反応後の固相上に存在するプローブの構造を検出する

方法については以下に説明するように種々の公知の方法が使用できる。

(1) 連結体に結合している標識部（抗原、酵素、蛍光、ラジオアイソトープ等）の存在を検出する。例えば、標識部が抗原の場合、酵素結合抗体により認識させ、その酵素による基質の発色を検出することで確認することができる。

5 (2) プローブの連結反応後、切断部を開裂した後に、切断部を含んでいる方のプローブの標的核酸認識部の相補鎖あるいは該プローブ内の別の配列の相補鎖を持つラベル化オリゴヌクレオチド（例えば蛍光標識オリゴヌクレオチド）を添加して検出する方法が可能である。

10 (3) または固相上に存在する核酸の質量の減少を、例えば表面プラズモン共鳴方法等により検出することでプローブの減少を確認することが出来る。

以下実施例に基づき本発明を具体的に説明するが、本発明はその要旨を超えない限り以下の実施例に限定されるものではない。

ここで、核酸の合成は、一般的にホスホロアミダイト固相合成法による自動核酸合成機にて合成し、イオン交換 HPLC にて精製（純度 99%以上）した。

15 5' リン酸化は、5'-Phosphate-ON Phosphoramidite を、5' ビオチン化は Biotin Amidite を、3' ビオチン化は 3' Biotin-ON CPG を、ジスルフィド結合は C6-Disulfide Phosphoramidite を、オリゴヌクレオチド鎖内へのアミノ基の導入には Uni-Link Amino Modifier を用いた。以上の試薬は、CLONTECH 社より入手可能である。デオキシウリジンの導入には、dU-CE Phosphoramidite (Glen Research  
20 製) を用いた。

また、オリゴヌクレオチドへの蛍光色素 BODIPY493/503、Rhodamine Red、TEXAS Red や抗原ジゴキシゲニン の導入には、Uni-Link Amino Modifier によりオリゴヌクレオチド鎖内に導入したアミノ基に、BODIPY493/503 C3-SE、Rhodamine Red-X succinimidyl ester、TEXAS Red-X succinimidyl ester（いずれも Molecular Probes 社製）あるいは Digoxigenin-3-O-methyl-carbonyl- $\epsilon$ -aminocaproic  
25 acid-N-hydroxysuccinimide ester（ベーリンガー・マンハイム社製）を公知の



方法により反応させて行った。

(実施例)

(1) プロープの溶液中でのジスルフィド結合切断実験

5 (1-1) 5'末端をビオチン化した20塩基のオリゴヌクレオチドからなるプロープ2 A、5'-(ビオチン)-GGTGGCGGCCGCTCTAGAAC-3'を通常ホスホロアミダイト固相合成法により自動合成した。

(1-2) 5'末端をビオチン化し、ジスルフィド結合([SS]と表記)を導入した22塩基のオリゴヌクレオチドからなるプロープ2 B、5'-(ビオチン)-TT-[SS]-GGTGGCGGCCGCTCTAGAAC-3'を通常ホスホロアミダイト固相合成法により自動合成した。

10 (1-3) 5'末端をビオチン化し、ジスルフィド結合を導入した25塩基のオリゴヌクレオチドからなるプロープ2 C、5'-(ビオチン)-TTTTT-[SS]-GGTGGCGGCCGCTCTAGAAC-3'を通常ホスホロアミダイト固相合成法により自動合成した。

15 (1-4) 5'末端をビオチン化し、ジスルフィド結合を導入した30塩基のオリゴヌクレオチドからなるプロープ2 D、5'-(ビオチン)-TTTTTTTTTT-[SS]-GGTGGCGGCCGCTCTAGAAC-3'を通常ホスホロアミダイト固相合成法により自動合成した。

20 (1-5) (1-1)、(1-2)、(1-3)、(1-4)で得られたプロープ(それぞれ400nM)を、1×SSPE(150mM NaCl, 10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1mM EDTA, pH7.4)中で100℃にて5分間加熱し、すぐに氷冷した。それぞれのプロープ溶液に1Mジチオスレイトール(DTTと略記する)を100mMとなるように添加し、37℃にて10分間放置した。固相となる、ストレプトアビジンでコートされたBIAcoreセンサーチップ(ファルマシア:SA5)と、DTT-プロープ溶液を37℃にて5分間反応させたときの固相の質量変化を表面プラズモン共鳴測定装置(ファルマシア:BIAcore2000)にて観察

したところ、ジスルフィド結合を含まないプローブ 2 A で 1487 レゾナンスユニット（表面プラズモン共鳴における反射光の減衰角度を表す値で、固相表面の質量変化を反映する）の上昇を認めたのに対し、ジスルフィド結合を含むプローブ 2 B では 504 レゾナンスユニットの上昇、プローブ 2 C では 588 レゾナンスユニットの上昇、プローブ 2 D では 935 レゾナンスユニットの上昇が観測された。ジスルフィド結合を含まないプローブ 2 A に比較して、ジスルフィド結合を含む、

## (2) プローブの固相上でのジスルフィド結合切断実験

### (2-1) プローブの固相化

(1-1)、(1-2)、(1-3)、(1-4)で得られたプローブ（それぞれ 400nm）を、1×SSPE 中で 100℃にて 5 分間加熱し、すぐに氷冷した。これらのプローブ溶液を、ストレプトアビジンでコートされた BIAcore センサーチップと 37℃にて 5 分間反応させた後、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム水溶液、10mM 水酸化ナトリウム水溶液、10mM 塩酸水溶液を 37℃にて 1 分間ずつ順次反応させて、固相と結合しなかった

### (2-2) DTT との反応

(2-1)で調製した、それぞれのプローブを固相化したチップと 100mM DTT を含む 1×SSPE 中にて 37℃にて 10 分間反応させたときの固相の質量変化を表面プラズモン共鳴測定装置にて観察したところジスルフィド結合を含まないプローブ 2 A で 31 レゾナンスユニットの上昇、ジスルフィド結合を含むプローブ 2 B では 544 レゾナンスユニットの減少、プローブ 2 C では 495 レゾナンスユニットの減少、プローブ 2 D では 313 レゾナンスユニットの減少を認めた。プローブ 2 A を除いて、ジスルフィド結合を含むプローブ 2 B、プローブ 2 C、プローブ 1 D 各プローブでレゾナンスユニットが大きく減少したことは、DTT によりジスルフィド結合が固相上で切断を受けたことを示す。

### (3) 標的核酸の検出 (表面プラズモン共鳴)

(3-1) 3'末端をビオチン化し、5'末端をリン酸化した20塩基のオリゴヌクレオチドからなるプローブ1、5'-(P)-TAGTGGATCCCCCGGGCTGC-(ビオチン)3'を通常のホスホロアミダイト固相合成法により自動合成した。

- 5 (3-2) プローブ2Aあるいはプローブ2Bあるいはプローブ2Cあるいはプローブ2Dのうちの1つと(3-1)で得られたプローブ1を隣接して保持できる標的核酸として以下の配列を有する40塩基のオリゴヌクレオチドからなる標的核酸Aを合成した。

5'-GCAGCCCGGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACC-3'

- 10 (3-3) プローブの固相化

プローブ2B、プローブ1と標的核酸A (それぞれ400nM) あるいはプローブ2C、プローブ1と標的核酸A (それぞれ400nM) を1×SSPE中で混合し、100℃にて5分間加熱変性させ、その後55℃にて10分間保つことによりハイブリダイズさせた。このハイブリッド体を1×SSPEで10倍に希釈し、ストレプトアビジンでコートされたBIAcoreセンサーチップと37℃にて5分間反応させてプローブを固相化した後、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム水溶液、10mM水酸化ナトリウム水溶液、10mM塩酸水溶液でそれぞれ37℃にて1分間ずつ順次反応させ、標的核酸Aをプローブより解離させた。

- 15 (3-4) 標的核酸のハイブリダイゼーション

- 20 (3-3)で2つのプローブを隣接して保持していた標的核酸Aが解離した固相に、標的核酸A (400nM) を1×SSPE中にて37℃にて5分間反応させた。

- (3-5) 固相上でのリガーゼ反応

- 25 (3-4)で標的核酸Aをハイブリダイズした固相に、添付の反応緩衝液で希釈したT4 DNAリガーゼ (宝酒造: 1mlあたり3500IUのリガーゼを含む) を37℃にて5分間反応させた後、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム水溶液、10mM水酸化ナトリウム水溶液、10mM塩酸水溶液を37℃にて1分間順次反応させ、標的核酸Aをプロ

ープより解離させた。

### (3-6) DTT によるジスルフィド結合の切断

(3-5)で調製した固相に 100mM DTT を含む 1×SSPE 中で 37°Cにて 10 分間反応させたときの固相の質量変化を表面プラズモン共鳴測定装置にて観察したところ、  
5 プローブ 2 B／プローブ 1 では 67 レゾナンスユニットの減少を、プローブ 2 C  
／プローブ 1 では 71 レゾナンスユニットの減少を認めた。一方、(3-4)で標的核酸 A をハイブリダイズさせずに T4 DNA リガーゼを反応させた固相については  
プローブ 2 B／プローブ 1 では 136 レゾナンスユニットの減少を、プローブ 2 C／  
10 プローブ 1 では 131 レゾナンスユニットの減少を認めた。プローブ 2 B／プローブ 1、プローブ 2 C／プローブ 1 それぞれにおいて、標的核酸 A をハイブリダイズさせなかった固相に比べて、標的核酸 A をハイブリダイズさせた固相のレゾナンスユニットの減少が抑えられたのは、プローブ 2 B とプローブ 1 あるいはプローブ 2 C とプローブ 1 の両プローブが標的核酸 A とハイブリダイズして隣接して保持され、T4 DNA リガーゼにより両プローブが連結されたために、DTT による  
15 プローブ 2 B あるいはプローブ 2 C のジスルフィド結合の切断を受けてもプローブ 2 B あるいはプローブ 2 C の標的核酸認識配列が洗い流されずに固相上に残り、固相上の大きな質量変化が起きなかったためである。以上の結果は、本法により標的核酸の検出が可能であることを示している。

### (4) 蛍光色素標識プローブの溶液中でのジスルフィド結合切断実験

20 (4-1) 5' 末端をビオチン化し、ジスルフィド結合および蛍光色素 BODIPY493 /503 (F と表記) を導入した 20 塩基のオリゴヌクレオチドからなるプローブ 2 E、5'-(ビオチン)-[SS]-F-GGTGGCGGCCGCTCTAGAAC-3' を通常のホスホロアミダイト固相合成法により自動合成した。

(4-2) プローブ 2 A とプローブ 2 E (それぞれ 400nM) を、1×SSPE 中で 100°C  
25 にて 5 分間加熱し、すぐに氷冷した。それぞれのプローブ溶液に 1M DTT を 100mM となるように添加し、37°Cにて 10 分間放置した。ストレプトアビジンでコート

された BIAcore センサーチップと DTT-プローブ溶液を 37°C にて 5 分間反応させたときの固相の質量変化を表面プラズモン共鳴測定装置にて観察したところ、ジスルフィド結合を含まないプローブ 2 A で 1377 レゾナンスユニットの上昇を認めたのに対し、ジスルフィド結合を含むプローブ 2 E では 103 レゾナンスユニットの上昇にとどまった。プローブ 2 E を 1mM DTT で反応させた場合は 717 レゾナンスユニットの上昇を認め、DTT 濃度が高いほど固相化量が少なかった。この結果は、DTT によりプローブ 2 E のジスルフィド結合が溶液中で切断されたことを示す。

#### (5) 蛍光色素標識プローブの固相上でのジスルフィド結合切断実験

##### (5-1) アビジンコートチップの調製

200mM 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (SIGMA) を含む 50mM N-ヒドロキシスクシンイミド (SIGMA) 溶液を表面プラズモン共鳴測定装置にてカルボキシメチルデキストランが結合した BIAcore 用センサーチップ (ファルマシア: CM5) と 37°C にて 7 分間反応させた後、1ml あたり 100 $\mu$ g のアビジン (SIGMA) を含む 10mM 酢酸緩衝液 pH5.0 を 37°C にて 1~8 分間反応させ、水酸化ナトリウム水溶液で pH8.5 に調製した 1M エタノールアミンハイドロクロリドを 37°C にて 7 分間添加して反応を止めた。

##### (5-2) プローブの固相化

プローブ 2 E (400nM) を、1 $\times$ SSPE 中で 100°C にて 5 分間加熱し、すぐに氷冷した。このプローブ溶液を、(5-1) で調製した、アビジンでコートされた BIAcore センサーチップと 37°C にて 5 分間反応させた後、0.1% ドデシル硫酸ナトリウム水溶液、10mM 水酸化ナトリウム水溶液、10mM 塩酸水溶液でそれぞれ 37°C にて 1 分間ずつ順次洗浄した。

##### (5-3) DTT との反応

(5-2) で調製した、プローブ 2 E を固相化したチップと 100mM DTT を含む 1 $\times$ SSPE を 37°C にて 10 分間反応させた。0.1% ドデシル硫酸ナトリウム水溶液、10mM 水酸

化ナトリウム水溶液、10mM 塩酸水溶液でそれぞれ 37°Cにて1分間ずつ順次洗浄したときの固相の質量変化を表面プラズモン共鳴測定装置にて観察したところ 1400~2100 レゾナンスユニットの減少を認めた。この結果は DTT によりプローブ 2 E のジスルフィド結合が固相上で切断されたことを示す。

5 (6) 蛍光色素標識プローブを用いた標的核酸の検出 (表面プラズモン共鳴)

(6-1) プローブ調製

標的核酸 A の 5' 末端から 20 番目の塩基と 21 番目の塩基の間にアデノシンを挿入した、41 塩基のオリゴヌクレオチドからなる 1 塩基過剰配列、  
5'-GCAGCCCGGGGATCCACTAAGTTCTAGAGCGGCCGCCACC-3' を通常ホスホロアミダイト固相合成法により自動合成した。

(6-2) 標的核酸 A の 5' 末端から 20 番目の塩基のアデノシンを欠損した、39 塩基のオリゴヌクレオチドからなる 1 塩基欠損配列、  
5'-GCAGCCCGGGGATCCACTGTTCTAGAGCGGCCGCCACC-3' を通常ホスホロアミダイト固相合成法により自動合成した。

15 (6-3) アビジンをコートしたセンサーチップの調製

200mM 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドを含む 50mM N-ヒドロキシスクシンイミド溶液を表面プラズモン共鳴測定装置にてカルボキシメチルデキストランが結合した BIAcore センサーチップ CM5 と 37°Cにて7分間反応させた後、1ml あたり 5 $\mu$ g のアビジンを含む 10mM 酢酸緩衝液 pH5.0 を 37°Cにて1~8分間反応させ、水酸化ナトリウム水溶液で pH8.5 に調製した 1M エタノールアミンハイドロクロリドを 37°Cにて7分間添加して反応を止めた。

20 (6-4) プローブの固相化

プローブ 2 E、プローブ 1 と標的核酸 A (それぞれ 400nM) を 1 $\times$ SSPE 中で混合し、100°Cにて5分間加熱変性させ、その後 55°Cにて10分間保つことによりハイブリダイズさせた。このハイブリッド体を 1 $\times$ SSPE で 10 倍に希釈し、(6-3)で調製したアビジンでコートされた BIAcore センサーチップと 37°Cにて5分間反

応させてプローブを固相化した後、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム水溶液、10mM 水酸化ナトリウム水溶液、10mM 塩酸水溶液でそれぞれ 37°Cにて1分間ずつ順次反応させて、標的核酸Aをプローブより解離させた。

(6-5) 標的核酸A及びその変異核酸のハイブリダイゼーション

- 5 (6-4)で2つのプローブを隣接して保持していた標的核酸Aが解離した固相の別々の場所に、標的核酸Aとその変異核酸である1塩基過剰配列、1塩基欠損配列（各400nM）を1×SSPE中で37°Cにて5分間反応させたときの固相の質量変化を表面プラズモン共鳴測定装置にて観察したところ 337~379 レゾナンスユニットの上昇を認め、(6-4)で調製した固相が標的核酸Aとその変異核酸である1塩基過剰配列、1塩基欠損配列とハイブリダイズすることを確認した。このことは
- 10 いずれの配列も固相と結合し、ハイブリダイゼーションに基づく結合量からは検出しようとする核酸配列と、これとはわずかに異なる核酸配列を区別することができないことを示している。標的核酸等何もハイブリダイズさせなかった場合は、6レゾナンスユニットの上昇にとどまった。

15 (6-6) 固相上でのリガーゼ反応

- (6-5)で標的核酸Aとその変異核酸である1塩基過剰配列、1塩基欠損配列をハイブリダイズさせた固相に、添付の反応緩衝液で希釈したT4 DNA リガーゼ（1mlあたり3500IUのリガーゼを含む）を37°Cにて5分間反応させた後、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム水溶液、10mM 水酸化ナトリウム水溶液、10mM 塩酸水溶液でそれぞれ 37°Cにて1分間ずつ順次反応させて、標的核酸A及びその変異核酸を
- 20 プローブより解離させた。

(6-7) DTTによるジスルフィド結合の切断

- (6-6)で調製した固相に、100mM DTTを含む1×SSPE中で37°Cにて10分間反応させたときの固相の質量変化を表面プラズモン共鳴測定装置にて観察したところ、
- 25 1塩基欠損配列をハイブリダイズさせた固相については82レゾナンスユニットの減少、1塩基過剰配列をハイブリダイズさせた固相については95レゾナンス

ユニットの減少、標的核酸等何もハイブリダイズさせなかった固相については 116 レゾナンスユニットの減少を認めた。一方、標的核酸 A をハイブリダイズさせた固相については 54 レゾナンスユニットの減少にとどまった。他に比べて標的核酸 A をハイブリダイズさせた固相でレゾナンスユニットの減少が抑えられたのは、プローブ 2 E とプローブ 1 の両プローブが標的核酸 A とハイブリダイズして隣接して保持され、T4 DNA リガーゼにより連結されたために、DTT によるプローブ 2 E のジスルフィド結合の切断を受けてもプローブ 2 E の標的核酸認識配列が洗い流されずに固相上に残り固相上の大きな質量変化が起きなかったからである。この結果は、標的核酸の、プローブ連結付近の配列の 1 塩基の違いを認識したことを示す。

#### (7) ジゴキシゲニン標識プローブの切断実験

##### (7-1) プローブの調製

5' 末端をビオチン化、オリゴヌクレオチド鎖内にジゴキシゲニン修飾（本明細書中、又は図中で [DIG] と表記される場合がある）を施し、ビオチンとジゴキシゲニンの間にチミジンを 2 個導入した、22 塩基のオリゴヌクレオチドからなるプローブ 2 F、5'-(ビオチン)-TT-[DIG]-GGTGGCGGCCGCTCTAGAAC-3' を通常のホスホロアミダイト固相合成法により自動合成した。

(7-2) 5' 末端をビオチン化、オリゴヌクレオチド鎖内にジスルフィド結合及びジゴキシゲニン修飾を施し、ビオチンとジスルフィド結合の間にチミジンを 2 個導入した、22 塩基のオリゴヌクレオチドからなるプローブ 2 G、5'-(ビオチン)-TT-[SS]-[DIG]-GGTGGCGGCCGCTCTAGAAC-3' を通常のホスホロアミダイト固相合成法により自動合成した。

##### (7-3) プローブの固相化

プローブ 2 F およびプローブ 2 G（それぞれ 500pM）を、1×SSPE 中で 95℃にて 5 分間加熱し、すぐに氷冷した。これらのプローブ溶液を、ノーザンエリーザ（ベーリンガー・マンハイム：ジゴキシゲニン検出 ELISA キット）に添付の、スト



レプトアビジンでコートされた 96 穴マイクロタイタープレートに 1 ウェルあたり 94  $\mu$ l 添加し、振盪しながら 37°C にて 30 分間反応させた。

#### (7-4) DTT によるジスルフィド結合の切断

各ウェルをノーザンエリーザに添付の洗浄液 250  $\mu$ l で 3 回洗浄後、1M、100mM、  
5 1mM 各濃度の DTT を含む 1×SSPE を 1 ウェルあたり 100  $\mu$ l 添加して、振盪しながら 37°C にて 30 分間反応させた。

#### (7-5) ジゴキシゲニン検出

各ウェルを洗浄液 250  $\mu$ l で 3 回洗浄後、ノーザンエリーザに添付の Anti-DIG-POD

(ペルオキシダーゼ結合抗ジゴキシゲニン抗体：1 ウェルあたり 5mU の抗体を含む 100  $\mu$ l を添加) と振盪しながら 37°C にて 30 分間反応させた。各ウェルを洗  
10 浄液 250  $\mu$ l で 3 回洗浄後、ノーザンエリーザに添付の TMB Substrate Solution

(ペルオキシダーゼ基質トリメチルベンジジン、1 ウェルあたり 100  $\mu$ l を添加)

と室温にて 5 分間反応させ、ノーザンエリーザに添付の Stop Reagent (1 ウェル

あたり 100  $\mu$ l を添加) で反応を止めた。ペルオキシダーゼの働きによりトリメ  
15 チルベンジジンは青色を発する生成物へと変化し増幅される。Stop Reagent を

添加することにより青色を発する生成物の増幅反応がストップされ、溶液は黄色

を呈する。450nm から 500nm の波長の光の吸光度の大きさにより、ウェル内のペ

ルオキシダーゼの量、ひいてはジゴキシゲニンの量を評価することができる。マ

イクロプレートリーダー SPECTRA MAX 250 (Molecular Devices) を用いて 470nm

20 の吸光度を測定した結果を表に示す。(2 ウェルの平均値)

=====				
DTT 濃度	1M	100mM	1mM	0mM
プローブ 2 F	2.82	3.26	3.22	3.30
プローブ 2 G	0.03	0.12	2.12	2.99

=====

25 数値が大きいほどマイクロタイタープレートのウェルにジゴキシゲニンが多く存

5 在していることを意味する。上の表より、ジスルフィド結合を含まないプローブ 2 F では、DTT 濃度の如何にかかわらず 470nm 吸光度は変わらないが、ジスルフィド結合を含むプローブ 2 G では DTT の濃度変化に応じて 470nm 吸光度が変化することが観測された。この結果は、DTT によりジスルフィド結合が固相上で切断されることを示す。

#### (8) ビオチン-ジスルフィド結合間に導入したスペーサーの有無によるジスルフィド結合切断効率の比較検討

##### (8-1) プローブの調製

10 5' 末端をビオチン化、オリゴヌクレオチド鎖内にジスルフィド結合及びジゴキシゲニン修飾を施し、ビオチンとジスルフィド結合の間にチミジンを 1 つも導入しない 20 塩基のオリゴヌクレオチドからなるプローブ 2 H、5'-(ビオチン)-[SS]-[DIG]-GGTGGCGCCGCTCTAGAAC-3' を通常のホスホロアミダイト固相合成法により自動合成した。

15 (8-2) 5' 末端をビオチン化、オリゴヌクレオチド鎖内にジスルフィド結合及びジゴキシゲニン修飾を施し、ビオチンとジスルフィド結合の間にチミジンを 5 個導入した、25 塩基のオリゴヌクレオチドからなるプローブ 2 I、5'-(ビオチン)-TTTTT-[SS]-[DIG]-GGTGGCGCCGCTCTAGAAC-3' を通常のホスホロアミダイト固相合成法により自動合成した。

20 (8-3) 5' 末端をビオチン化、オリゴヌクレオチド鎖内にジスルフィド結合及びジゴキシゲニン修飾を施し、ビオチンとジスルフィド結合の間にチミジンを 10 個導入した、30 塩基のオリゴヌクレオチドからなるプローブ 2 J、5'-(ビオチン)-TTTTTTTTTT-[SS]-[DIG]-GGTGGCGCCGCTCTAGAAC-3' を通常のホスホロアミダイト固相合成法により自動合成した。

##### (8-4) プローブの固相化

25 プローブ 2 G、プローブ 2 H、プローブ 2 I およびプローブ 2 J (それぞれ 500pM) を、1×SSPE 中で 95℃にて 5 分間加熱し、すぐに氷冷した。これらのプ

プローブ溶液を、ノーザンエリーザに添付のストレプトアビジンでコートされた 96 穴マイクロタイタープレートに 1 ウェル当たり 94  $\mu$ l 添加して、振盪しながら 37°C にて 30 分間反応させた。

(8-5) DTT によるジスルフィド結合の切断

- 5 各ウェルをノーザンエリーザに添付の洗浄液 250  $\mu$ l で 3 回洗浄後、DTT (500mM、100mM、0M) と 0.1% ドデシル硫酸ナトリウムを含む 1 $\times$ SSPE を 1 ウェルあたり 100  $\mu$ l 添加し、振盪しながら 37°C にて 30 分間反応させた。

(8-6) ジゴキシゲニン検出

- 10 各ウェルを洗浄液 250  $\mu$ l で 3 回洗浄後、ノーザンエリーザに添付の Anti-DIG-POD (1 ウェルあたり 5mU の抗体を含む 100  $\mu$ l を添加) と振盪しながら 37°C にて 30 分間反応させた。各ウェルを洗浄液 250  $\mu$ l で 3 回洗浄後、ノーザンエリーザに添付の TMB Substrate Solution (1 ウェルあたり 100  $\mu$ l を添加) と室温にて 5 分間反応させ、ノーザンエリーザに添付の Stop Reagent (1 ウェルあたり 100  $\mu$ l を添加) で反応を止めた。マイクロプレートリーダー SPECTRA MAX 250 を用いて 490nm の吸光度を測定した結果を表に示す。数値は、固相上に残るジゴキシゲニンの量を、DTT 濃度 0M で処理したときの 490nm 吸光度を 100 とした時の残存率で表したものである。(2 ウェルの平均値)
- 15

=====

	DTT 濃度	DTT 濃度		
		500mM	100mM	0M
20	プローブ 2H (チミジン 0 個)	27.5	75.0	100
	プローブ 2G (チミジン 2 個)	4.4	24.0	100
	プローブ 2I (チミジン 5 個)	3.9	21.4	100
	プローブ 2J (チミジン 10 個)	4.3	19.1	100

=====

- 25 ビオチンとジスルフィド結合の間にチミジンを 2 個以上導入したプローブ (2 G、2 I、2 J) では、いずれも DTT 濃度 100mM で 20% 前後、500mM で 4% 前後であ

るのに対し、プローブ 2Hでは、DTT 濃度 100mM において約 3 倍 (75%)、500mM において約 6 倍 (28%) 高い数値を与えた。これは、ビオチンとジスルフィド結合の間に十分なスペーサーを設けなかったことにより、ジスルフィド結合の切断が効率よく行われなかったことを示す。この結果から、固相上においてプローブの切断部であるジスルフィド結合での切断反応の効率化を図るには、固相固定部であるビオチンとジスルフィド結合の間にスペーサーを導入する方が好ましい。

#### (9) ジゴキシゲニン標識プローブを用いた標的核酸の検出 (酵素抗体法(比色))

##### (9-1) プローブの固相化

プローブ 1、プローブ 2 G、標的核酸 A (それぞれ 300pM) を 1×SSPE 中で混合し、95℃にて 5 分間加熱変性させ、その後 55℃にて 10 分間保つことによりハイブリダイズさせた。このハイブリッド体をノーザンエリーザに添付の、ストレプトアビジンでコートされた 96 穴マイクロタイタープレートに 1 ウェル当たり 94μl 添加して、振盪しながら 37℃にて 30 分間反応させた。各ウェルをノーザンエリーザに添付の洗浄液 250μl で 3 回洗浄後、15mM 水酸化ナトリウム水溶液を 1 ウェルあたり 100μl 添加し、37℃にて 30 分間反応させて標的核酸 A をプローブより解離した。

##### (9-2) 標的核酸 A 及びその変異核酸のハイブリダイゼーション

(9-1)でプローブを固相化したそれぞれのウェルに、標的核酸 A とその変異核酸である 1 塩基過剰配列、1 塩基欠損配列 (それぞれ 600pM) を 1 ウェルあたり 100μl 添加し、1×SSPE 中で 37℃にて 30 分間反応させた後、各ウェルを洗浄液 250μl で 3 回洗浄した。

##### (9-3) 固相上でのリガーゼ反応

(9-2)で調製したウェルに、添付の反応緩衝液で希釈した T4 DNA リガーゼ (1 ウェルあたり 30IU のリガーゼを含む 100μl) を添加し、37℃にて 30 分間反応させた。洗浄液で 3 回洗浄後、20mM 水酸化ナトリウム水溶液で 37℃にて 30 分間反応させ、標的核酸 A 及びその変異核酸である 1 塩基過剰配列、1 塩基欠損配列を

プローブから解離した。

(9-4) DTT によるジスルフィド結合の切断

(9-3)で調製したウェルに、1M の DTT を含む 1×SSPE を 1 ウェルあたり 100 $\mu$ l 添加し、室温にて 30 分間反応後、各ウェルを洗浄液 250 $\mu$ l で 3 回、1.0%ドデシル硫酸ナトリウム水溶液 100 $\mu$ l で 1 回洗浄した。

(9-5) ジゴキシゲニン検出

(9-4)で調製したウェルに、ノーザンエリーザに添付の Anti-DIG-POD (1 ウェルあたり 5mU の抗体を含む 100 $\mu$ l を添加) を振盪しながら 37°Cにて 30 分間反応させた。各ウェルを洗浄液 250 $\mu$ l で 4 回洗浄後、ノーザンエリーザに添付の TMB Substrate Solution (1 ウェルあたり 100 $\mu$ l を添加) と室温にて 10 分間反応させ、ノーザンエリーザに添付の Stop Reagent (1 ウェルあたり 100 $\mu$ l を添加) で反応を止めた。マイクロプレートリーダー SPECTRA MAX 250 を用いて 460nm の吸光度を測定した結果を以下に示す。(3 ウェルの平均値 $\pm$ 標準偏差値)

=====			
標的核酸 A	1 塩基過剰配列	1 塩基欠損配列	核酸無添加
0.861 $\pm$ 0.077	0.182 $\pm$ 0.052	0.140 $\pm$ 0.019	0.137 $\pm$ 0.052
=====			

変異核酸である 1 塩基過剰配列、1 塩基欠損配列は、核酸を添加しなかったウェルと同等の値を示し、標的核酸 A のみ有意に大きな値を示した。標的核酸の、プローブ連結付近の配列の 1 塩基の違いを認識したことを示している。この実験結果より、標的核酸の有無を検出できることを証明した。

(10) ジゴキシゲニン標識プローブを用いた標的核酸の検出 (蛍光抗体法、図 9)

(10-1) プローブの固相化

プローブ 1、プローブ 2 G、標的核酸 A (それぞれ 500nM) を 1×SSPE 中で混合し、95°Cにて 5 分間加熱変性させ、その後 55°Cにて 10 分間保つことによりハイブリダイズさせた。このハイブリッド体を、ストレプトアビジンでコートされた

黒色の 96 穴マイクロタイタープレート（ベーリンガー・マンハイム）に 1 ウェルあたり 94  $\mu$ l 添加して、振盪しながら 37°C にて 30 分間反応させた。各ウェルをノーザンエリーザに添付の洗浄液 250  $\mu$ l で 3 回洗浄後、0.1% ドデシル硫酸ナトリウムを含む 10mM 水酸化ナトリウム水溶液を 1 ウェルあたり 100  $\mu$ l 添加し、

5 37°C にて 10 分間反応させて標的核酸 A をプローブより解離した。

#### (10-2) 標的核酸 A 及びその変異核酸のハイブリダイゼーション

(10-1) でプローブを固相化したそれぞれのウェルに、標的核酸 A とその変異核酸である 1 塩基過剰配列、1 塩基欠損配列（それぞれ 1  $\mu$ M）を 1 ウェルあたり 100  $\mu$ l 添加し、1×SSPE 中で 37°C にて 30 分間反応させた後、各ウェルを洗浄液 250  $\mu$ l で 3 回洗浄した。

10

#### (10-3) 固相上でのリガーゼ反応

(10-2) で調製したウェルに、添付の反応緩衝液で希釈した T4 DNA リガーゼ（1 ウェルあたり 30IU のリガーゼを含む 100  $\mu$ l）を添加し、37°C にて 30 分間反応させた。洗浄液で 3 回洗浄後、0.1% ドデシル硫酸ナトリウムを含む 10mM 水酸化ナトリウム水溶液を 1 ウェルあたり 100  $\mu$ l 添加し、37°C にて 10 分間反応させ、

15 標的核酸 A およびその変異核酸をプローブから解離した。

#### (10-4) DTT によるジスルフィド結合の切断

(10-3) で調製したウェルに、500mM の DTT と 0.1% ドデシル硫酸ナトリウムを含む 1×SSPE を 1 ウェルあたり 100  $\mu$ l 添加し、室温にて 30 分間反応後、各ウェルを洗浄液 250  $\mu$ l で 3 回洗浄した。

20

#### (10-5) ローダミン標識抗 DIG 抗体との反応

(10-4) で調製したウェルに、ローダミン標識抗ジゴキシゲニン抗体（ベーリンガー・マンハイム：1 ウェルあたり 2  $\mu$ g の抗体を含む 100  $\mu$ l）を添加し、37°C にて 30 分間反応させた後、各ウェルを洗浄液 250  $\mu$ l で 3 回洗浄した。

#### (10-6) 蛍光検出

(10-5) で調製したウェルに、1×SSPE を 1 ウェルあたり 100  $\mu$ l 添加し、蛍光ブ

25

レートリダーフルオロスキャン II (大日本製薬) を用いて励起波長 584nm、観測波長 612nm で測定した結果を以下に示す。(3 ウェルの平均値±標準偏差値)

標的核酸 A	1 塩基過剰配列	1 塩基欠損配列	核酸無添加
0.133±0.005	0.115±0.006	0.094±0.010	0.080±0.013

標的核酸 A では、核酸無添加時に比べて明らかに大きな数値を与えた。変異核酸である 1 塩基過剰配列、1 塩基欠損配列は、核酸無添加の数値よりわずかに大きい。標的核酸 A に比べて有意に小さい数値を示した。この実験結果より、標的核酸の有無を検出できることを証明した。

#### (11) ジゴキシゲニン標識プローブを用いた標的核酸の検出 (酵素抗体法(蛍光)、図 10)

##### (11-1) プローブの固相化

プローブ 1、プローブ 2 G、標的核酸 A (それぞれ 100nM) を 1×SSPE 中で混合し、95℃にて 5 分間加熱変性させ、その後 55℃にて 10 分間保つことによりハイブリダイズさせた。このハイブリッド体を、ストレプトアビジンでコートされた黒色の 96 穴マイクロタイタープレートに 1 ウェルあたり 94μl 添加して、振盪しながら 37℃にて 30 分間反応させた。各ウェルをノーザンエリーザに添付の洗浄液 250μl で 3 回洗浄後、0.1%ドデシル硫酸ナトリウムを含む 10mM 水酸化ナトリウム水溶液を 1 ウェルあたり 100μl 添加し、37℃にて 10 分間反応させて標的核酸 A をプローブより解離した。

##### (11-2) 標的核酸 A 及びその変異核酸のハイブリダイゼーション

(11-1) でプローブを固相化したそれぞれのウェルに、標的核酸 A とその変異核酸である 1 塩基過剰配列、1 塩基欠損配列 (それぞれ 200nM) を 1 ウェルあたり 100μl 添加し、1×SSPE 中で 37℃にて 30 分間反応させた後、各ウェルを洗浄液 250μl で 3 回洗浄した。

## (11-3) 固相上でのリガーゼ反応

(11-2)で調製したウェルに、添付の反応緩衝液で希釈した T4 DNA リガーゼ (1 ウェルあたり 30IU のリガーゼを含む 100 $\mu$ l) を添加し、37°Cにて 30 分間反応させた。各ウェルを洗浄液 250 $\mu$ l で 3 回洗浄後、0.1%ドデシル硫酸ナトリウムを含む 10mM 水酸化ナトリウム水溶液を 1 ウェルあたり 100 $\mu$ l 添加し、37°Cにて 10 分間反応させ、標的核酸 A およびその変異核酸をプローブから解離した。

## (11-4) DTT によるジスルフィド結合の切断

(11-3)で調製したウェルに、500mM の DTT と 0.1%ドデシル硫酸ナトリウムを含む 1 $\times$ SSPE を 1 ウェルあたり 100 $\mu$ l 添加し、室温にて 30 分間反応後、各ウェルを洗浄液 250 $\mu$ l で 3 回洗浄した。

## (11-5) ジゴキシゲニン検出

(11-4)で調製したウェルに、アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体 (ペーリンガー・マンハイム: 1 ウェルあたり 7.5mU の抗体を含む 100 $\mu$ l) を添加し、37°Cにて 30 分間反応させた後、各ウェルを洗浄液 250 $\mu$ l で 3 回洗浄した。アルカリフォスファターゼ基質として蛍光生成物を与える AttoPhos (ペーリンガー・マンハイム) を 1 ウェルあたり 100 $\mu$ l 添加し、37°Cにて 30 分間反応させた後、蛍光プレートリーダーフルオロスキャン II を用いて励起波長 485nm、観測波長 590nm で測定した結果を以下に示す。(4 ウェルの平均値 $\pm$ 標準偏差値)

=====			
標的核酸 A	1 塩基過剰配列	1 塩基欠損配列	核酸無添加
230.4 $\pm$ 15.2	159.3 $\pm$ 6.2	132.0 $\pm$ 9.3	63.5 $\pm$ 2.8
=====			

標的核酸 A では、核酸無添加時に比べて明らかに大きな数値を与えた。変異核酸である 1 塩基過剰配列、1 塩基欠損配列は、核酸無添加の数値より大きい。標的核酸 A に比べて有意に小さい数値を示した。この実験結果より、標的核酸の有無を検出できることを証明した。



(12) Rhodamine Red 標識プローブを用いた標的核酸の検出 (図 8A)

(12-1) 5' 末端をビオチン化、オリゴヌクレオチド鎖内にジスルフィド結合及び蛍光色素 Rhodamine Red ([RR]と表記) 修飾を施し、ビオチンとジスルフィド結合の間にチミジンを 2 個導入した、22 塩基のオリゴヌクレオチドからなるプローブ 2 K、5'-(ビオチン)-TT-[SS]-[RR]-GGTGGCGGCCGCTCTAGAAC-3' を通常のホスホロアミダイト固相合成法により自動合成した。

(12-2) プローブの固相化

プローブ 1、プローブ 2 K、標的核酸 A (それぞれ 750nM) を 1×SSPE 中で混合し、95°Cにて 5 分間加熱変性させ、その後 55°Cにて 10 分間保つことによりハイブリダイズさせた。このハイブリッド体を、ストレプトアビジンでコートされた黒色の 96 穴マイクロタイタープレートに 1 ウェルあたり 94μl 添加し、振盪しながら 37°Cにて 30 分間反応させた。各ウェルをノーザンエリーザに添付の洗浄液 250μl で 3 回洗浄後、20mM 水酸化ナトリウム水溶液を 1 ウェルあたり 100μl 添加し、37°Cにて 7 分間反応させて標的核酸 A をプローブより解離した。

(12-3) 標的核酸 A 及びその変異核酸のハイブリダイゼーション

(12-2)でプローブを固相化したそれぞれのウェルに、標的核酸 A とその変異核酸である 1 塩基過剰配列、1 塩基欠損配列 (それぞれ 1.5μM) を 1 ウェルあたり 100μl 添加し、1×SSPE 中で 37°Cにて 30 分間反応させた後、各ウェルを洗浄液 250μl で 4 回洗浄した。

(12-4) 固相上でのリガーゼ反応

(12-3)で調製したウェルに、添付の反応緩衝液で希釈した Ampligase (EPICENTRE TECHNOLOGIES 製: 耐熱性リガーゼ、1 ウェルあたり 20U のリガーゼを含む 100μl) を添加し、37°Cにて 30 分間反応させた。各ウェルを洗浄液 250μl で 4 回洗浄した後、20mM 水酸化ナトリウム水溶液を 1 ウェルあたり 100μl 添加し、37°Cにて 7 分間反応させて標的核酸 A およびその変異核酸をプローブより解離した。

(12-5) DTT によるジスルフィド結合の切断

(12-4)で調製したウェルに、400mM DTT と 0.1%ドデシル硫酸ナトリウムを含む 1×SSPE を 1 ウェルあたり 100 $\mu$ l 添加し、37°Cにて 30 分間反応後、各ウェル洗浄液 250 $\mu$ l で 4 回で洗浄した。

#### (12-6) 蛍光検出

- 5 (12-5)で調製したウェルに、1×SSPE を 1 ウェルあたり 100 $\mu$ l 添加し、蛍光プレートリーダーフルオロスキャン II を用いて励起波長 584nm、観測波長 612nm で測定した結果を以下に示す。(n=4 の平均値 $\pm$ 標準偏差値)

=====

標的核酸 A      1 塩基過剰配列   1 塩基欠損配列   核酸無添加

10 0.385 $\pm$ 0.020   0.199 $\pm$ 0.008   0.235 $\pm$ 0.005   0.229 $\pm$ 0.023

=====

標的核酸 A では、核酸無添加時に比べて有意に大きな数値を与えた。変異核酸である 1 塩基過剰配列、1 塩基欠損配列は、核酸無添加の数値とほぼ同じ数値を与え、標的核酸 A に比べて小さい数値を示した。この実験結果より、標的核酸の有無を検出できることを証明した。

15

#### (13) TEXAS Red 標識プローブを用いた標的核酸の検出 (図 8B)

(13-1) 5' 末端をビオチン化、オリゴヌクレオチド鎖内にジスルフィド結合及び蛍光色素 TEXAS Red ([TR]と表記) 修飾を施し、ビオチンとジスルフィド結合の間にチミジンを 2 個導入した、22 塩基のオリゴヌクレオチドからなるプローブ 2 L、

20

5'-(ビオチン)-TT-[SS]-[TR]-GGTGGCGCCGCTCTAGAAC-3' を通常のホスホロアミダイト固相合成法により自動合成した。

#### (13-2) プローブの固相化

プローブ 1、プローブ 2 L、標的核酸 A (それぞれ 1 $\mu$ M) を 1×SSPE 中で混合し、95°Cにて 5 分間加熱変性させ、その後 55°Cにて 10 分間保つことによりハイブリダイズさせた。このハイブリッド体を、ストレプトアビジンでコートされた黒色

25

の 96 穴マイクロタイタープレートに 1 ウェルあたりに 94  $\mu$ l 添加し、振盪しながら 37°C にて 30 分間反応させた。各ウェルをノーザンエリーザに添付の洗浄液 250  $\mu$ l で 3 回洗浄後、20mM 水酸化ナトリウム水溶液を 1 ウェルあたり 100  $\mu$ l 添加し、37°C にて 7 分間反応させて標的核酸 A をプローブより解離した。

5 (13-3) 標的核酸 A 及びその変異核酸のハイブリダイゼーション

(13-2) でプローブを固相化したそれぞれのウェルに、標的核酸 A とその変異核酸である 1 塩基過剰配列、1 塩基欠損配列 (それぞれ 2  $\mu$ M) を 1 ウェルあたり 100  $\mu$ l 添加し、1  $\times$  SSPE 中で 37°C にて 30 分間反応させた後、各ウェルを洗浄液 250  $\mu$ l で 4 回洗浄した。

10 (13-4) 固相上でのリガーゼ反応

(13-3) で調製したウェルに、添付の反応緩衝液で希釈した Ampligase (1 ウェルあたり 20U のリガーゼを含む 100  $\mu$ l) を添加し、37°C にて 30 分間反応させた。各ウェルを洗浄液 250  $\mu$ l で 4 回洗浄した後、20mM 水酸化ナトリウム水溶液を 1 ウェルあたり 100  $\mu$ l 添加し、37°C にて 7 分間反応させて標的核酸 A およびその変異核酸をプローブより解離した。

15 (13-5) DTT によるジスルフィド結合の切断

(13-4) で調製したウェルに、500mM DTT と 0.1% ドデシル硫酸ナトリウムを含む 1  $\times$  SSPE を 1 ウェルあたり 100  $\mu$ l 添加し、37°C にて 50 分間反応後、各ウェルを洗浄液 250  $\mu$ l で 4 回で洗浄した。

20 (13-6) 蛍光検出

(13-5) で調製したウェルに、1  $\times$  SSPE を 1 ウェルあたり 100  $\mu$ l 添加し、蛍光プレートリーダーフルオロスキャン II を用いて励起波長 584nm、観測波長 612nm で測定した結果を以下に示す。(n=4 の平均値  $\pm$  標準偏差値)

=====

25	標的核酸 A	1 塩基過剰配列	1 塩基欠損配列	核酸無添加
	0.128 $\pm$ 0.010	0.054 $\pm$ 0.007	0.062 $\pm$ 0.004	0.058 $\pm$ 0.011

標的核酸 A では、核酸無添加時に比べて有意に大きな数値を与えた。変異核酸である 1 塩基過剰配列、1 塩基欠損配列は、核酸無添加の数値とほぼ同じ数値を与え、標的核酸 A に比べて小さい数値を示した。この実験結果より、標的核酸の有無を検出できることを証明した。

(14) ジゴキシゲニン標識プローブを用いた標的核酸の検出 (酵素抗体法 (化学発光)、図 11)

(14-1) プローブの固相化

プローブ 1、プローブ 2 G、標的核酸 A (それぞれ 100pM) を 1×SSPE 中で混合し、95℃にて 5 分間加熱変性させ、その後 55℃にて 10 分間保つことによりハイブリダイズさせた。このハイブリッド体を、ストレプトアビジンでコートされた黒色の 96 穴マイクロタイタープレートに 1 ウェルあたり 94μl 添加して、振盪しながら 37℃にて 10 分間反応させた。各ウェルをノーザンエリーザに添付の洗浄液 250μl で 3 回洗浄後、20mM 水酸化ナトリウム水溶液を 1 ウェルあたり 100μl 添加し、37℃にて 5 分間反応させて標的核酸 A をプローブより解離した。

(14-2) 標的核酸 A 及びその変異核酸のハイブリダイゼーション

(14-1) でプローブを固相化したそれぞれのウェルに、標的核酸 A とその変異核酸である 1 塩基過剰配列、1 塩基欠損配列 (それぞれ 1nM) を 1 ウェルあたり 100μl 添加し、1×SSPE 中で 37℃にて 60 分間反応させた後、各ウェルを洗浄液 250μl で 4 回洗浄した。

(14-3) 固相上でのリガーゼ反応

(14-2) で調製したウェルに、添付の反応緩衝液で希釈した Ampligase (1 ウェルあたり 10U のリガーゼを含む 100μl) を添加し、37℃にて 15 分間反応させた後、各ウェルを洗浄液 250μl で 4 回洗浄した。

(14-4) DTT によるジスルフィド結合の切断

(14-3) で調製したウェルに、400mM DTT と 0.1% ドデシル硫酸ナトリウムを含む

0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) を 1 ウェルあたり 100 $\mu$ l 添加し、37°Cにて 30 分間反応した。各ウェルを洗浄液 250 $\mu$ l で 4 回洗浄した後、20mM 水酸化ナトリウム水溶液を 1 ウェルあたり 100 $\mu$ l 添加し、37°Cにて 5 分間反応させて標的核酸 A およびその変異核酸をプローブより解離した。

#### 5 (14-5) ジゴキシゲニン検出

(14-4)で調製したウェルに、1%牛血清アルブミン含有リン酸緩衝溶液に溶解したペルオキシダーゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体 (1 ウェルあたり 5mU の抗体を含む 100 $\mu$ l) を添加し、37°Cにて 30 分間反応させた後、各ウェルを洗浄液 250 $\mu$ l で 4 回洗浄した。BM Chemiluminescence ELISA Reagent (ペーリンガー・マンハイム) に添付の Substrate reagent A (ルミノールおよび 4-ヨードフェノール含有、1 ウェルあたり 99 $\mu$ l) および Starting reagent B (過酸化水素含有、1 ウェルあたり 1 $\mu$ l) を添加し、室温にて 5 分間反応させた後、発光プレートリーダー MLR100 (コロナ産業) を用いて測定した結果を以下に示す。(n=4 の平均値 $\pm$ 標準偏差値)

15

標的核酸 A	1 塩基過剰配列	1 塩基欠損配列	核酸無添加
20556 $\pm$ 442	1487 $\pm$ 84	1757 $\pm$ 114	1394 $\pm$ 113

20 標的核酸 A では、核酸無添加時に比べて有意に大きな数値を与えた。変異核酸である 1 塩基過剰配列、1 塩基欠損配列は、核酸無添加の数値より大きいが標的核酸 A に比べて小さい数値を示した。この実験結果より、標的核酸の有無を検出できることを証明した。

#### (15) 切断部としてデオキシウリジンを導入したプローブによる核酸検出

25 (15-1) 5' 末端をビオチン化、オリゴヌクレオチド鎖内にデオキシウリジン (dU と表記) 及びジゴキシゲニン修飾を施した、25 塩基のオリゴヌクレオチドからなるプローブ 2 M、

5'-(ビオチン)-dUdUdUdU-[DIG]-GGTGGCGCCGCTCTAGAAC-3' を通常ホスホロアミダイト固相合成法により自動合成した。

(15-2) 標的核酸Aに相補的な配列を有する40塩基のオリゴヌクレオチドからなる標的核酸A相補配列、5'-GGTGGCGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCGGGCTGC-3' を通常ホスホロアミダイト固相合成法により自動合成した。

#### (15-3) プローブの固相化

プローブ1、プローブ2M、標的核酸A（それぞれ500pM）を1×SSPE中で混合し、95℃にて5分間加熱変性させ、その後55℃にて10分間保つことによりハイブリダイズさせた。このハイブリッド体をノーザンエリーザに添付の、ストレプトアビジンでコートされた96穴マイクロタイタープレートに1ウェルあたり94μl添加し、振盪しながら37℃にて10分間反応させた。各ウェルをノーザンエリーザに添付の洗浄液250μlで3回洗浄後、20mM水酸化ナトリウム水溶液を1ウェルあたり100μl添加し、37℃にて5分間反応させて標的核酸Aをプローブより解離した。

#### (15-4) 標的核酸A及び標的核酸A相補配列のハイブリダイゼーション

(15-3)でプローブを固相化したそれぞれのウェルに、標的核酸Aとこれに相補的な配列からなる標的核酸A相補配列（それぞれ1nM）を1ウェルあたり100μl添加し、1×SSPE中で37℃にて60分間反応させた後、各ウェルを洗浄液250μlで4回洗浄した。

#### (15-5) 固相上でのリガーゼ反応

(15-4)で調製したウェルに、添付の反応緩衝液で希釈したAmpligase（1ウェルあたり10Uのリガーゼを含む100μl）を添加し、37℃にて15分間反応させた。各ウェルを洗浄液250μlで4回洗浄後、20mM水酸化ナトリウム水溶液を1ウェルあたり100μl添加し、37℃にて5分間反応させ、標的核酸A及び標的核酸A相補配列をプローブから解離した。

#### (15-6) ウラシルDNAグリコシダーゼによるデオキシウリジン鎖の切断

(15-5)で調製したウェルに、添付の反応緩衝液で希釈したウラシル DNA グリコシダーゼ (アマシャム: 1 ウェルあたり 5U の酵素を含む 100  $\mu$ l) を添加し、室温にて 30 分間反応させた。各ウェルを洗浄液 250  $\mu$ l で 4 回洗浄後、1.0M トリス塩酸緩衝液 (pH10.0) を 1 ウェルあたり 100  $\mu$ l 添加し、70°Cにて 10 分間放置した。各ウェルを洗浄液 250  $\mu$ l で 4 回洗浄後、20mM 水酸化ナトリウム水溶液を 1 ウェルあたり 100  $\mu$ l 添加し、37°Cにて 5 分間反応させて標的核酸 A および標的核酸 A 相補配列をプローブより解離した。

#### (15-7) ジゴキシゲニン検出

(15-6)で調製したウェルに、ノーザンエリーザに添付の Anti-DIG-POD (1 ウェルあたり 5mU の抗体を含む 100  $\mu$ l) を添加し、振盪しながら 37°Cにて 30 分間反応させた。各ウェルを洗浄液 250  $\mu$ l で 4 回洗浄後、ノーザンエリーザに添付の TMB Substrate Solution(1 ウェルあたり 100  $\mu$ l 添加)と室温にて 10 分間反応させ、ノーザンエリーザに添付の Stop Reagent(1 ウェルあたり 100  $\mu$ l 添加)で反応を止めた。マイクロプレートリーダー SPECTRA MAX 250 を用いて 460nm の吸光度を測定した結果を以下に示す。(n=4 の平均値  $\pm$  標準偏差値)

標的核酸 A	標的核酸 A 相補配列	核酸無添加
0.383 $\pm$ 0.018	0.099 $\pm$ 0.011	0.119 $\pm$ 0.004

変異核酸である標的核酸 A 相補配列は、核酸を添加しなかったウェルと同等の値を示し、標的核酸 A のみ有意に大きな値を示した。この実験結果より、切断部をデオキシウリジンとした場合においても切断 (開裂) が起きること、また切断部としてデオキシウリジンを導入したプローブを使用しても標的核酸の有無を検出できることが証明された。

#### (16) 長鎖標的核酸 (100 塩基) の検出

(16-1) 標的核酸 A の配列を真ん中を含む、100 塩基のオリゴヌクレオチド

からなる標的核酸 B、5'-

CGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGATCCACTAGTTCTAGAGCGGCCGCCACCGC  
GGTGGAGCTCCAATTCGCCCTATAGTGA-3' を通常ホスホロアミダイト固相合成法により自動合成した。

5 (16-2) プローブの固相化

10 プローブ 1、プローブ 2 G、標的核酸 A (それぞれ 1nM) を 1×SSPE 中で混合し、95℃にて 5 分間加熱変性させ、その後 55℃にて 10 分間保つことによりハイブリダイズさせた。このハイブリッド体を、ストレプトアビジンでコートされた黒色の 96 穴マイクロタイタープレートに 1 ウェルあたり 94μl 添加し、振盪しながら 37℃にて 10 分間反応させた。各ウェルをノーザンエリーザに添付の洗浄液 250μl で 2 回洗浄後、20mM 水酸化ナトリウム水溶液を 1 ウェルあたり 100μl 添加し、37℃にて 5 分間反応させて標的核酸 A をプローブより解離した。

(16-3) 標的核酸 B 及び標的核酸 A のハイブリダイゼーション

15 (16-2) でプローブを固相化したそれぞれのウェルに、標的核酸 B と標的核酸 A (陽性対照) (それぞれ 1nM) を 1 ウェルあたり 100μl 添加し、1×SSPE 中で 60℃にて 60 分間反応させた後、各ウェルを洗浄液 250μl で 4 回洗浄した。

(16-4) 固相上でのリガーゼ反応

20 (16-3) で調製したウェルに、添付の反応緩衝液で希釈した Ampligase (1 ウェルあたり 10U のリガーゼを含む 100μl) を添加し、60℃にて 10 分間反応させたあと、各ウェルを洗浄液 250μl で 4 回洗浄した。

(16-5) DTT によるジスルフィド結合の切断

25 (16-4) で調製したウェルに、400mM DTT と 0.1% ドデシル硫酸ナトリウムを含む 0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) を 1 ウェルあたり 100μl 添加し、60℃にて 30 分間反応した。各ウェルを洗浄液 250μl で 5 回洗浄した後、20mM 水酸化ナトリウム水溶液を 1 ウェルあたり 100μl 添加し、60℃にて 5 分間反応させて標的核酸 B および標的核酸 A をプローブより解離した。



## (16-6) ジゴキシゲニン検出

(16-5)で調製したウェルに、ノーザンエリーザに添付の Anti-DIG-POD (1 ウェルあたり 5mU の抗体を含む 100  $\mu$ l) を添加し、振盪しながら 37°C にて 30 分間反応させた。各ウェルを洗浄液 250  $\mu$ l で 4 回洗浄後、ノーザンエリーザに添付の TMB Substrate Solution (1 ウェルあたり 100  $\mu$ l 添加) と室温にて 10 分間反応させ、

5 ノーザンエリーザに添付の Stop Reagent (1 ウェルあたり 100  $\mu$ l 添加) で反応を止めた。マイクロプレートリーダー SPECTRA MAX 250 を用いて 460nm の吸光度を測定した結果を以下に示す。(n=4 の平均値  $\pm$  標準偏差値)

10	標的核酸 B (100 塩基)	標的核酸 A (40 塩基)	核酸無添加
	0.171 $\pm$ 0.009	0.449 $\pm$ 0.017	0.011 $\pm$ 0.001

標的核酸 B (100 塩基) は、核酸無添加と比較して有意に大きな数値を与えたことから、標的核酸中にプローブが認識する配列以外に別の配列が含まれていても

15 検出できることを証明した。

## (17) 二本鎖標的核酸 (40 塩基対) の検出

## (17-1) プローブの固相化

プローブ 1、プローブ 2 G、標的核酸 A (それぞれ 1nM) を 1 $\times$ SSPE 中で混合し、95°C にて 5 分間加熱変性させ、その後 55°C にて 10 分間保つことによりハイブリダイズさせた。このハイブリッド体を、ストレプトアビジンでコートされた黒色の 96 穴マイクロタイタープレートに 1 ウェルあたり 90  $\mu$ l 添加し、振盪しながら 37°C にて 10 分間反応させた。各ウェルをノーザンエリーザに添付の洗浄液 250  $\mu$ l で 4 回洗浄後、20mM 水酸化ナトリウム水溶液を 1 ウェルあたり 100  $\mu$ l 添加し、37°C にて 5 分間反応させて標的核酸 A をプローブより解離した。

## (17-2) 標的核酸 A 及びその変異核酸のハイブリダイゼーション

(17-1) でプローブを固相化したそれぞれのウェルに、2 $\times$ SSPE を 1 ウェルあたり

90  $\mu$ l 添加した後、標的核酸 A と標的核酸 A 相補配列からなる二本鎖核酸、標的核酸 A (陽性対照) および標的核酸 A 相補配列 (陰性対照) を 1nM 含む 0.01  $\times$  SSPE を 1 ウェルあたり 10  $\mu$ l 添加し (最終濃度 100pM)、37°C にて 60 分間反応させた後、各ウェルを洗浄液 250  $\mu$ l で 4 回洗浄した。

5 (17-3) 固相上でのリガーゼ反応

(17-2) で調製したウェルに、添付の反応緩衝液で希釈した Ampligase (1 ウェルあたり 10U のリガーゼを含む 100  $\mu$ l) を添加し、37°C にて 15 分間反応させたあと、各ウェルを洗浄液 250  $\mu$ l で 4 回洗浄した。

(17-4) DTT によるジスルフィド結合の切断

10 (17-3) で調製したウェルに、400mM DTT と 0.1% ドデシル硫酸ナトリウムを含む 0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH8.0) を 1 ウェルあたり 100  $\mu$ l 添加し、37°C にて 30 分間反応した。各ウェルを洗浄液 250  $\mu$ l で 4 回洗浄した後、20mM 水酸化ナトリウム水溶液を 1 ウェルあたり 100  $\mu$ l 添加し、37°C にて 5 分間反応させて二本鎖標的核酸およびコントロール核酸をプローブより解離した。

15 (17-5) ジゴキシゲニン検出

(17-4) で調製したウェルに、ノーザンエリーザに添付の Anti-DIG-POD (1 ウェルあたり 5mU の抗体を含む 100  $\mu$ l) を添加し、振盪しながら 37°C にて 30 分間反応させた。各ウェルを洗浄液 250  $\mu$ l で 4 回洗浄後、ノーザンエリーザに添付の TMB Substrate Solution (1 ウェルあたり 100  $\mu$ l 添加) と室温にて 10 分間反応させ、  
20 ノーザンエリーザに添付の Stop Reagent (1 ウェルあたり 100  $\mu$ l 添加) で反応を止めた。マイクロプレートリーダー SPECTRA MAX 250 を用いて 460nm の吸光度を測定した結果を以下に示す。(n=3 の平均値  $\pm$  標準偏差値)

=====

	二本鎖核酸	標的核酸 A	標的核酸 A 相補配列	核酸無添加
25	0.084 $\pm$ 0.006	0.095 $\pm$ 0.006	0.044 $\pm$ 0.004	0.039 $\pm$ 0.002

=====

二本鎖核酸は、核酸無添加時や標的核酸A相補配列に比べて有意に大きな、標的核酸Aに匹敵する数値を与えた。この実験結果より、二本鎖の試料を用いた場合も標的核酸が検出できることを証明した。

## 5 産業上の利用可能性

本発明に係るプローブ1及び2、また本発明に係る固相は、以上説明した構造を有するものであり、従って、本発明に係る固相上で標的核酸をハイブリダイズさせた場合、固相上のプローブはハイブリッド体を形成することに有利な空間位置を有し、効率的にハイブリッド体を形成する。従ってリガーゼ反応によりプローブ1及び2が効率的に結合する。さらにハイブリッド体の標的核酸を除いた後、切断部の切断反応により、上記結合したプローブ2のみが固相上に存在し得ることとなる。

従って、遊離のプローブ2を洗浄で除いた後、固相上の上記結合したプローブ2の存在を高感度でかつ、高認識で検出することが可能となる。このことは、標的核酸の存在を従来の方法に比較してより高感度かつ高認識で検出することを可能とするものである。

## 請求の範囲

1. (1) 標的核酸の連続する2つの特定の塩基配列A 1 A 2のうちのA 1と相補的な塩基配列B 1を有し、

(a)前記塩基配列B 1の5'末端がリン酸化され、

5 (b)前記塩基配列B 1の3'末端に第1の固相固定部が結合された、  
プローブ1と、

(2) 前記塩基配列A 1 A 2のうちのA 2と相補的な塩基配列B 2を有し、

(a)前記塩基配列B 2の5'末端が切断部の1端と結合され、かつ

(b)前記切断部の他端に第2の固相固定部が結合された、

10 プローブ2とからなる、

1組の標的核酸検出プローブ。

2. (1) 標的核酸の連続する2つの特定の塩基配列A 1 A 2のうちのA 1と相補的な塩基配列B 1を有し、

(a)前記塩基配列B 1の5'末端がリン酸化され、

15 (b)前記塩基配列B 1の3'末端が切断部の1端と結合され、かつ

(c)前記切断部の他端に第1の固相固定部が結合された、

プローブ1と、

(2) 前記塩基配列A 1 A 2のうちのA 2と相補的な塩基配列B 2を有し、

前記塩基配列B 2の5'末端に第2の固相固定部が結合された、

20 プローブ2とからなる、

1組の標的核酸検出プローブ。

3. 請求項1に記載の標的核酸検出プローブであって、

前記プローブ2が、前記塩基配列B 2の5'末端と前記切断部の間にさらに標識部を有することを特徴とする標的核酸検出プローブ。

25 4. 請求項2に記載の標的核酸検出プローブであって、

前記プローブ1が、前記塩基配列B 1の3'末端と前記切断部の間にさらに標

識部を有することを特徴とする標的核酸検出プローブ。

5. 請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の標的核酸検出プローブであって、

前記切断部が、ジスルフィド結合を有することを特徴とする標的核酸検出プローブ。

6. (1) 標的核酸の連続する 2 つの特定の塩基配列 A 1 A 2 のうちの A 1 と相補的な塩基配列 B 1 を有し、

(a) 前記塩基配列 B 1 の 5' 末端がリン酸化され、

(b) 前記塩基配列 B 1 の 3' 末端に第 1 の固相固定部が結合されたプローブ 1 が、

前記第 1 の固相固定部により表面に固定され、

(2) 前記塩基配列 A 1 A 2 のうちの A 2 と相補的な塩基配列 B 2 を有し、

(a) 前記塩基配列 B 2 の 5' 末端が切断部の 1 端と結合され、かつ

(b) 前記切断部の他端に第 2 の固相固定部が結合されたプローブ 2 が、

前記第 2 の固相固定部により表面に固定された、

標的核酸検出固相。

7. (1) 標的核酸の連続する 2 つの特定の塩基配列 A 1 A 2 のうちの A 1 と相補的な塩基配列 B 1 を有し、

(a) 前記塩基配列 B 1 の 5' 末端がリン酸化され、

(b) 前記塩基配列 B 1 の 3' 末端が切断部の 1 端と結合され、かつ

(c) 前記切断部の他端に第 1 の固相固定部が結合されたプローブ 1 が、

前記第 1 の固相固定部により表面に固定され、

(2) 前記塩基配列 A 1 A 2 のうちの A 2 と相補的な塩基配列 B 2 を有し、

前記塩基配列 B 2 の 5' 末端に第 2 の固相固定部が結合されたプローブ 2 が、

前記第 2 の固相固定部により表面に固定された、

標的核酸検出固相。

8. 請求項 6 に記載の標的核酸検出固相であって、

前記プローブ 2 が、前記塩基配列 B 2 の 5' 末端と前記切断部の間にさらに標識部を有することを特徴とする標的核酸検出固相。

9. 請求項 7 に記載の標的核酸検出固相であって、

5 前記プローブ 1 が、前記塩基配列 B 1 の 3' 末端と前記切断部の間にさらに標識部を有することを特徴とする標的核酸検出固相。

10. 請求項 6～9 のいずれか 1 項に記載の標的核酸検出固相であって、前記切断部が、ジスルフィド結合を有することを特徴とする標的核酸検出固相。

10 (A) (1) 標的核酸の連続する 2 つの特定の塩基配列 A 1 A 2 のうちの A 1 と相補的な塩基配列 B 1 を有し、

(a) 前記塩基配列 B 1 の 5' 末端がリン酸化され、

(b) 前記塩基配列 B 1 の 3' 末端に第 1 の固相固定部が結合された、  
プローブ 1 を前記第 1 の固相固定部で固相表面に固定し、

(2) 前記塩基配列 A 1 A 2 のうちの A 2 と相補的な塩基配列 B 2 を有し、

15 (a) 前記塩基配列 B 2 の 5' 末端が切断部の 1 端と結合され、かつ

(b) 前記切断部の他端に第 2 の固相固定部が結合された、

プローブ 2 を前記第 2 の固相固定部で固相表面に固定する第 1 の工程と、

(B) 前記プローブ 1 と、前記プローブ 2 と、前記標的核酸とをハイブリダイズしてハイブリッド体を形成する第 2 の工程と、

20 (C) 前記ハイブリッド体の前記プローブ 1 と前記プローブ 2 とをリガーゼ反応により結合する第 3 の工程と、

(D) 前記プローブ 2 の切断部を切断反応により切断する第 4 の工程と、

(E) 前記第 3 の工程により形成される、前記プローブ 2 の塩基配列 B 2 と前記切断部を結合した前記プローブ 1 を検出する第 5 の工程とを、含むことを特徴とする標的核酸検出方法。

25

12. (A) (1) 標的核酸の連続する 2 つの特定の塩基配列 A 1 A 2 の

うちのA 1と相補的な塩基配列B 1を有し、

(a)前記塩基配列B 1の5'末端がリン酸化され、

(b)前記塩基配列B 1の3'末端に切断部が結合され、かつ

(c)前記切断部の他端に第1の固相固定部が結合されたプローブ1を前記第1

5 の固相固定部で固相表面に固定し、

(2) 前記塩基配列A 1 A 2のうちのA 2と相補的な塩基配列B 2を有し、

前記塩基配列B 2の5'末端に第2の固相固定部が結合されたプローブ2を前記  
第2の固相固定部で固相表面に固定する第1の工程と、

(B) 前記プローブ1と、前記プローブ2と、前記標的核酸とをハイブリダイズ  
10 してハイブリッド体を形成する第2の工程と、

(C) 前記ハイブリッド体の前記プローブ1と前記プローブ2とをリガーゼ反応  
により結合する第3の工程と、

(D) 前記プローブ1の切断部を切断反応により切断する第4の工程と、

(E) 前記第3の工程により形成される、前記プローブ1の塩基配列B 1と前記切  
断部を結合した前記プローブ2を検出する第5の工程とを、含むことを特徴とす  
15 る標的核酸検出方法。

1 3. 請求項1 1に記載の標的核酸検出方法であって、

前記プローブ2が、前記塩基配列B 2の5'末端と前記切断部の間にさらに標  
識部を有し、前記標識部を検出することを特徴とする標的核酸検出方法。

20 1 4. 請求項1 2に記載の標的核酸検出方法であって、

前記プローブ1が、前記塩基配列B 1の3'末端と前記切断部の間にさらに標  
識部を有し、前記標識部を検出することを特徴とする標的核酸検出方法。

1 5. 請求項1 1～1 4のいずれか1項に記載の標的核酸検出方法で  
あって、

25 前記切断部が、ジスルフィド結合を有し、かつ前記第4の工程においてジスル  
フィド結合を還元剤により切断することを特徴とする標的核酸検出方法。

16. 請求項11～15のいずれか1項に記載の標的核酸検出方法であって、

前記第5の工程において、固相に結合しているプローブの質量を表面プラズモン共鳴法により検出することを特徴とする標的核酸検出方法。

5 17. (A) (1) 標的核酸の連続する2つの特定の塩基配列A1A2と、  
(2) 標的核酸の連続する2つの特定の塩基配列A1A2のうちのA1と相補的な塩基配列B1を有し、

(a)前記塩基配列B1の5'末端がリン酸化され、

(b)前記塩基配列B1の3'末端に第1の固相固定部が結合された、

10 プローブ1と、

(3) 前記塩基配列A1A2のうちのA2と相補的な塩基配列B2を有し、

(a)前記塩基配列B2の5'末端が切断部の1端と結合され、かつ

(b)前記切断部の他端に第2の固相固定部が結合された、

プローブ2とを、

15 ハイブリダイズしてハイブリッド体を形成する第1の工程と、

(B) 前記ハイブリッド体を、前記第1の固相固定部および前記第2の固相固定部で、固相表面に固定する第2の工程と、

(C) 前記ハイブリッド体から前記標的核酸を除去する第3の工程とを、  
有する標的核酸検出固相の製造方法。

20 18. (A) (1) 標的核酸の連続する2つの特定の塩基配列A1A2と、  
(2) 標的核酸の連続する2つの特定の塩基配列A1A2のうちのA1と相補的な塩基配列B1を有し、

(a)前記塩基配列B1の5'末端がリン酸化され、

(b)前記塩基配列B1の3'末端が切断部の1端と結合され、かつ

25 (c)前記切断部の他端に第1の固相固定部が結合された、  
プローブ1と、



(3) 前記塩基配列 A 1 A 2 のうちの A 2 と相補的な塩基配列 B 2 を有し、  
前記塩基配列 B 2 の 5' 末端に第 2 の固相固定部が結合された、  
プローブ 2 とを、

ハイブリダイズしてハイブリッド体を形成する第 1 の工程と、

5 (B) 前記ハイブリッド体を、前記第 1 の固相固定部および前記第 2 の固相固定  
部で、固相表面に固定する第 2 の工程と、

(C) 前記ハイブリッド体から前記標的核酸を除去する第 3 の工程とを、  
有する標的核酸検出固相の製造方法。

図 1

標的核酸

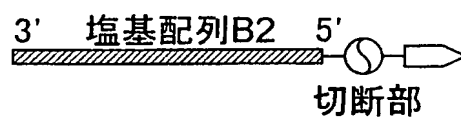


プローブ 1



P : リン酸

プローブ 2



標識部

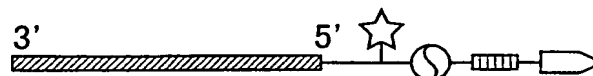


図 2

標的核酸

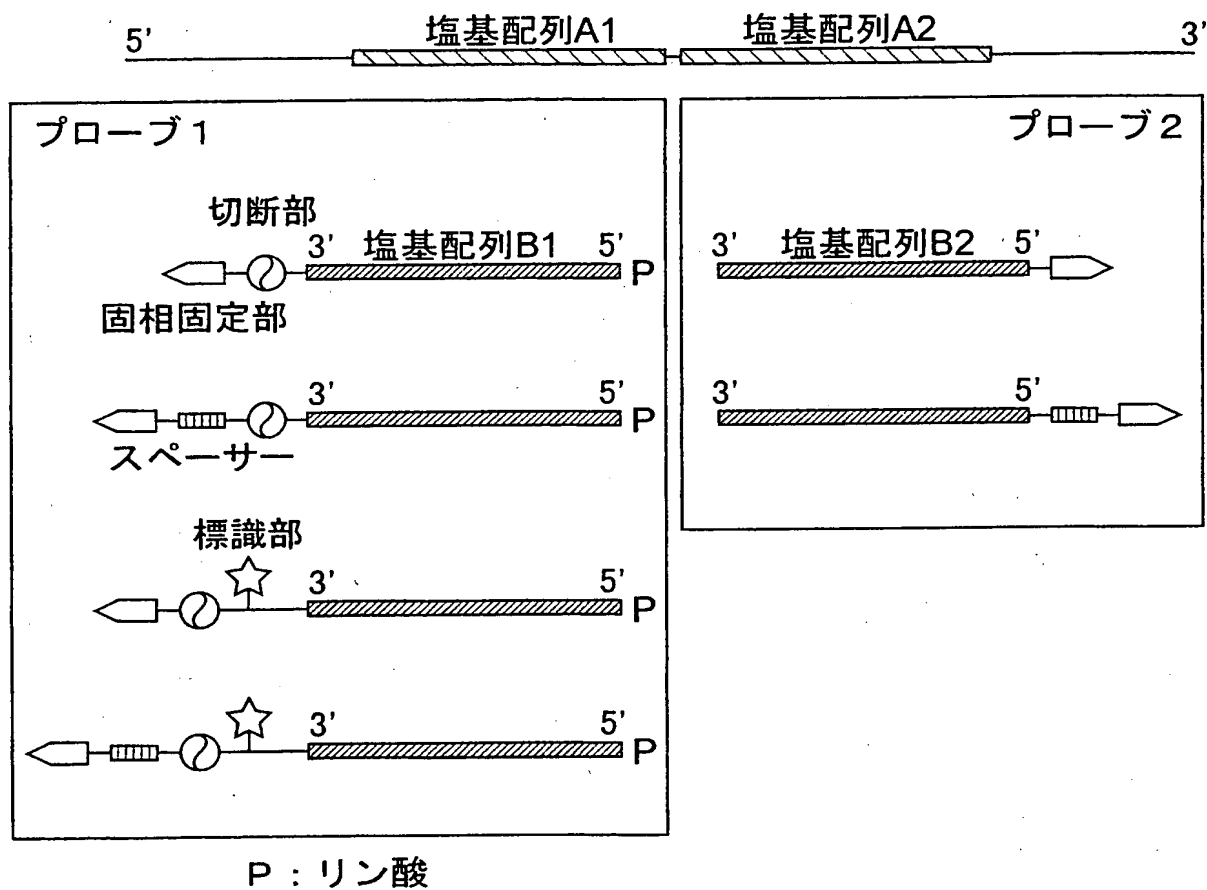


図 3

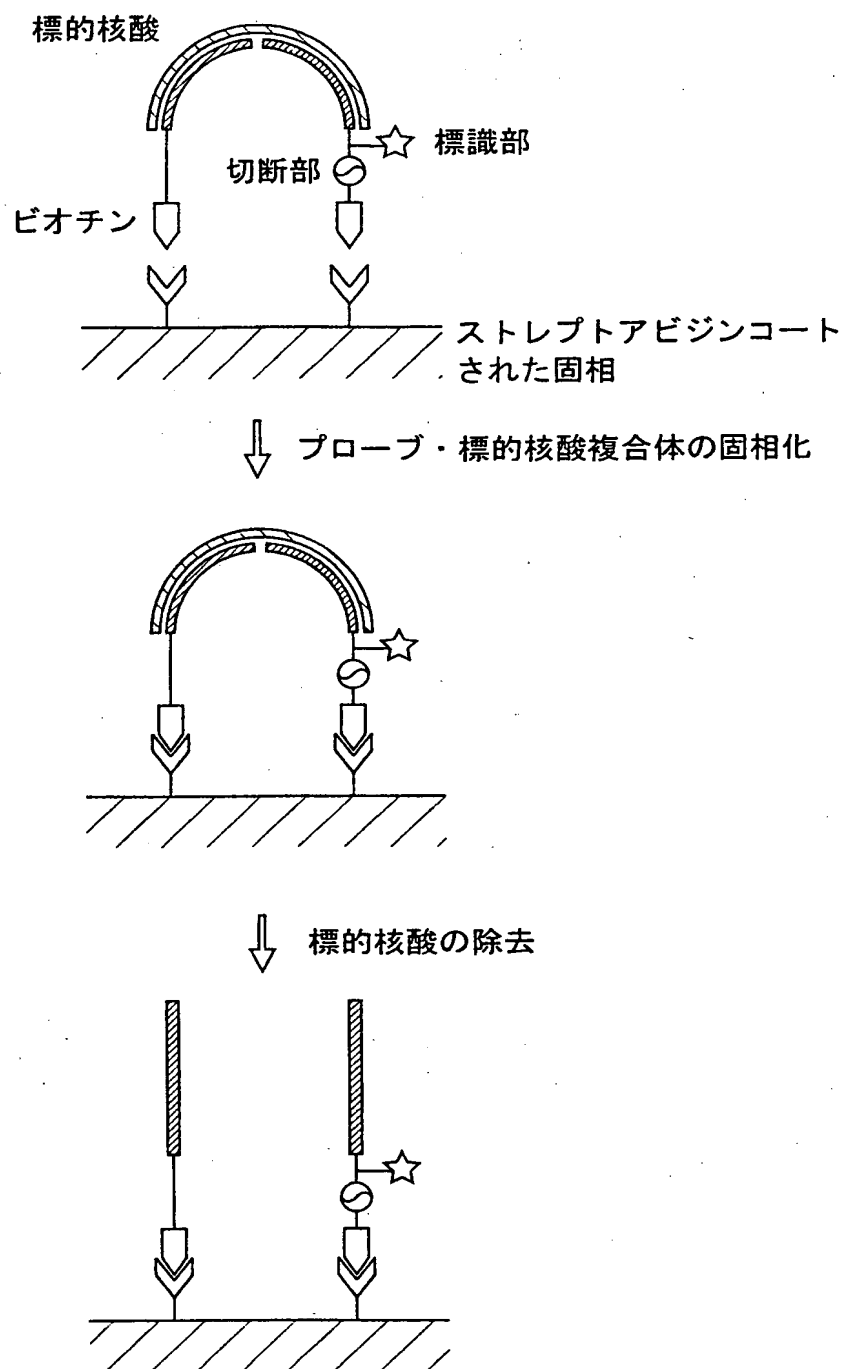


図 4

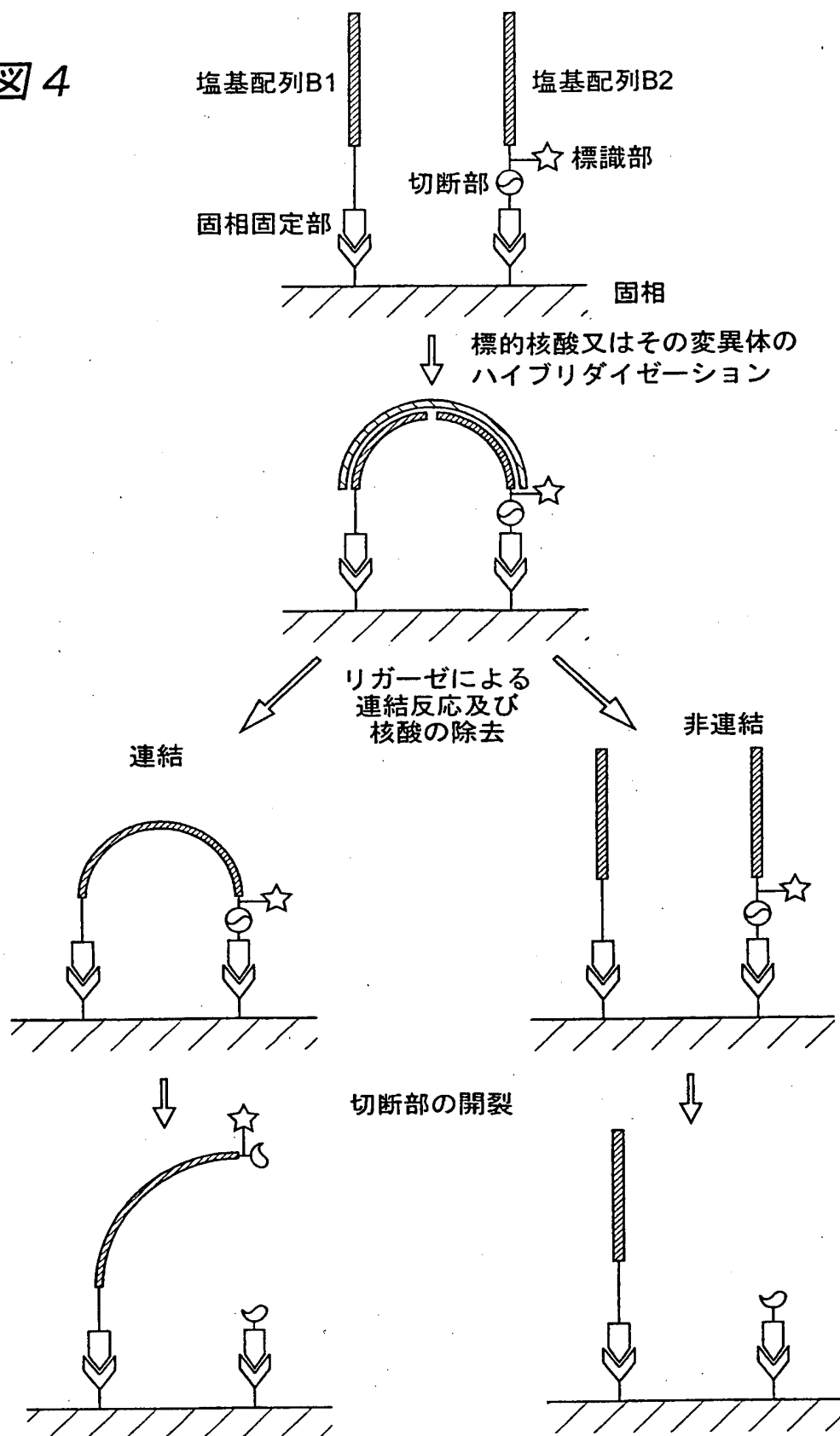
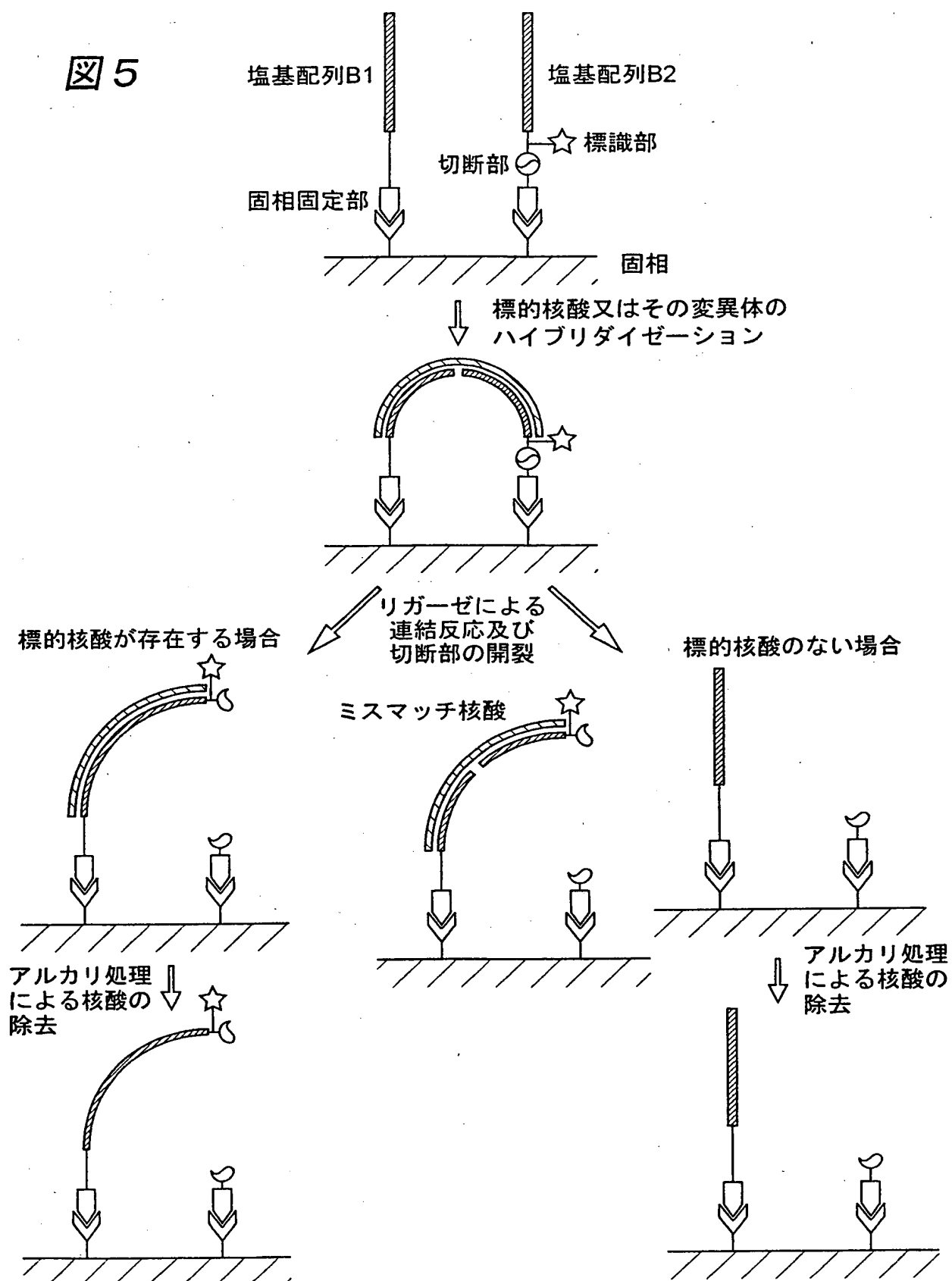
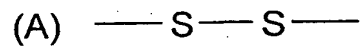


図 5



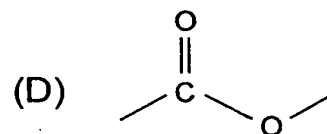
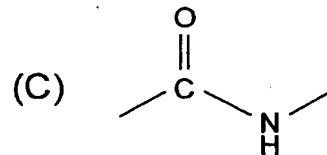
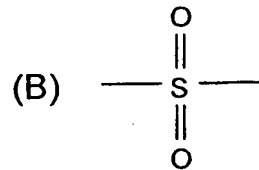
## 図 6

還元剤で切断

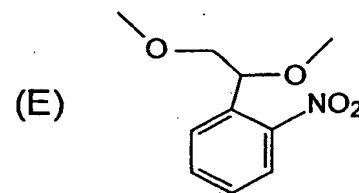


切断反応後に特有の切断端を一方に発生させることができる切断部

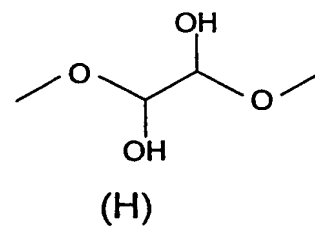
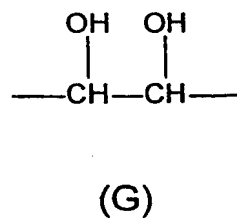
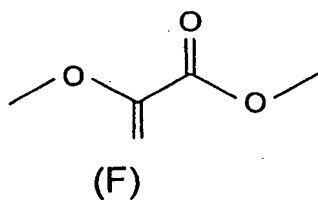
塩基性化合物で切断



光照射により切断



過酸化物で切断



ヒドロキシルアミンで切断

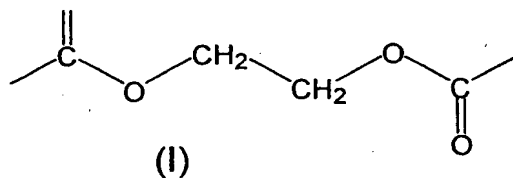
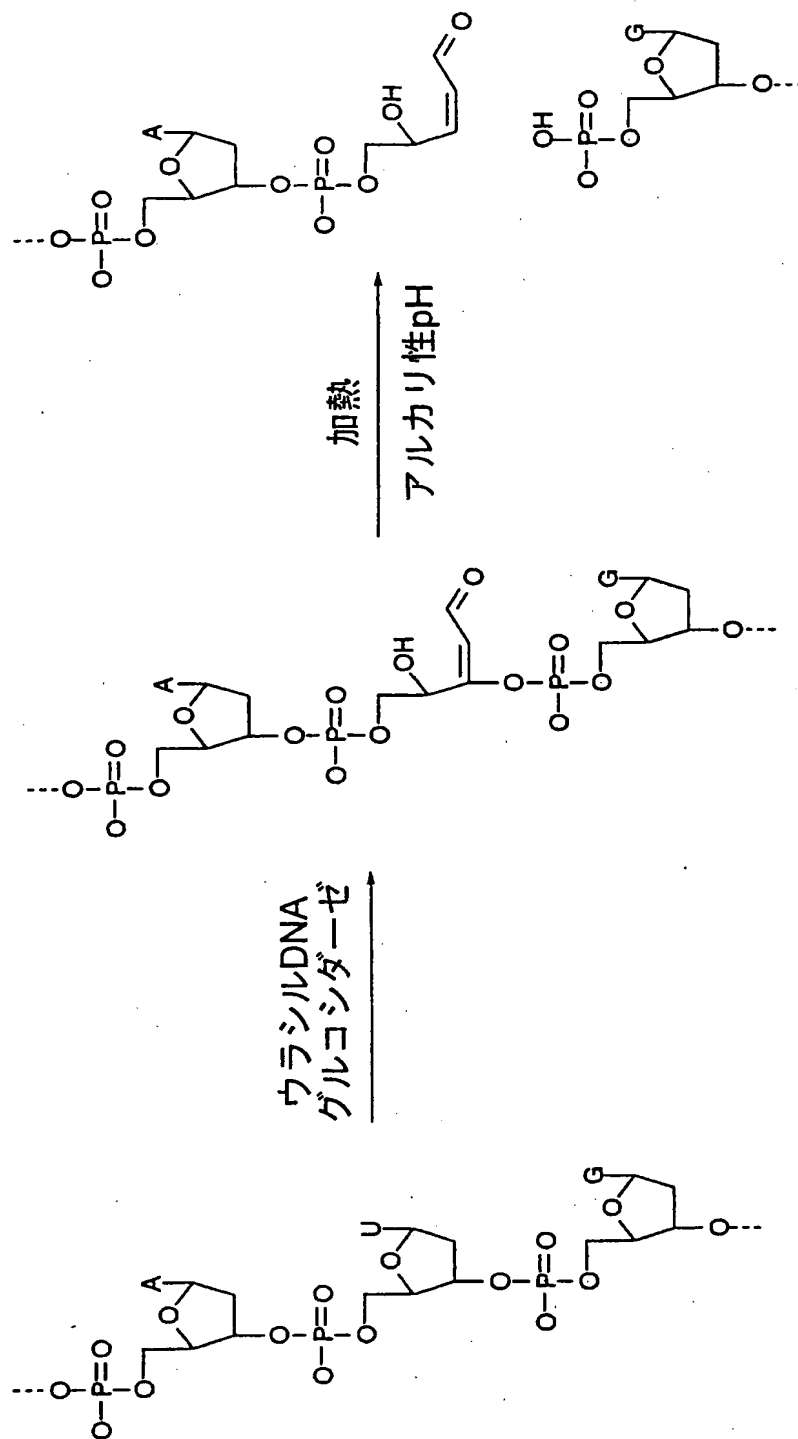


図7



7/11



図 8A

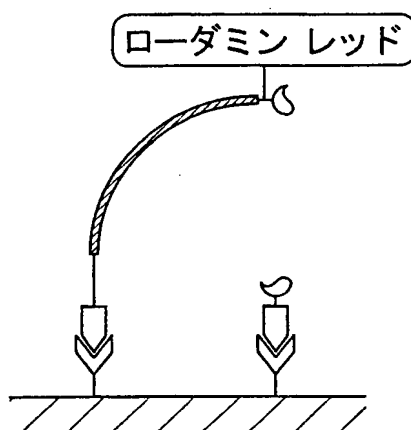


図 8B

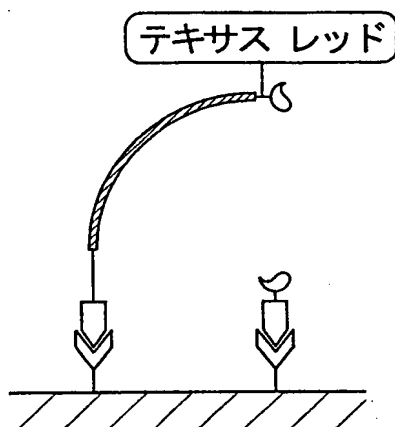


図 9

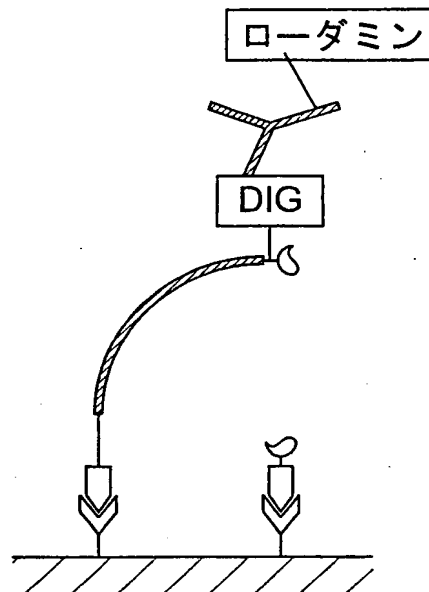
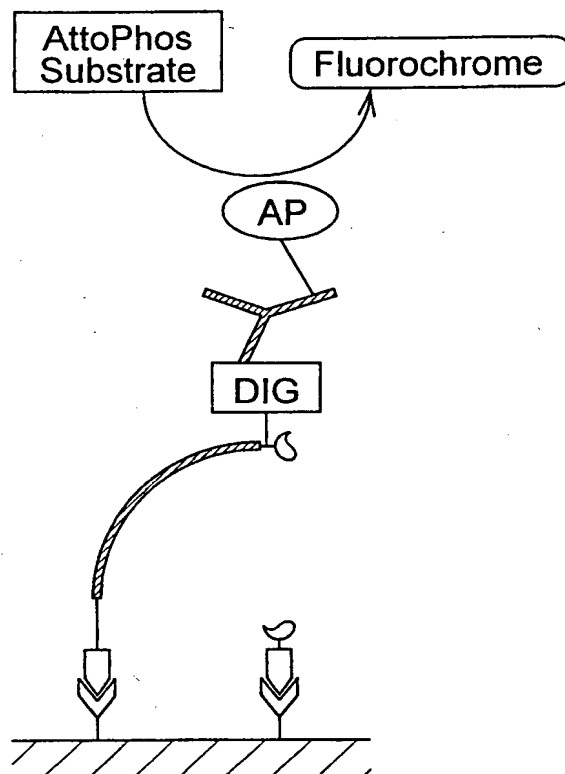
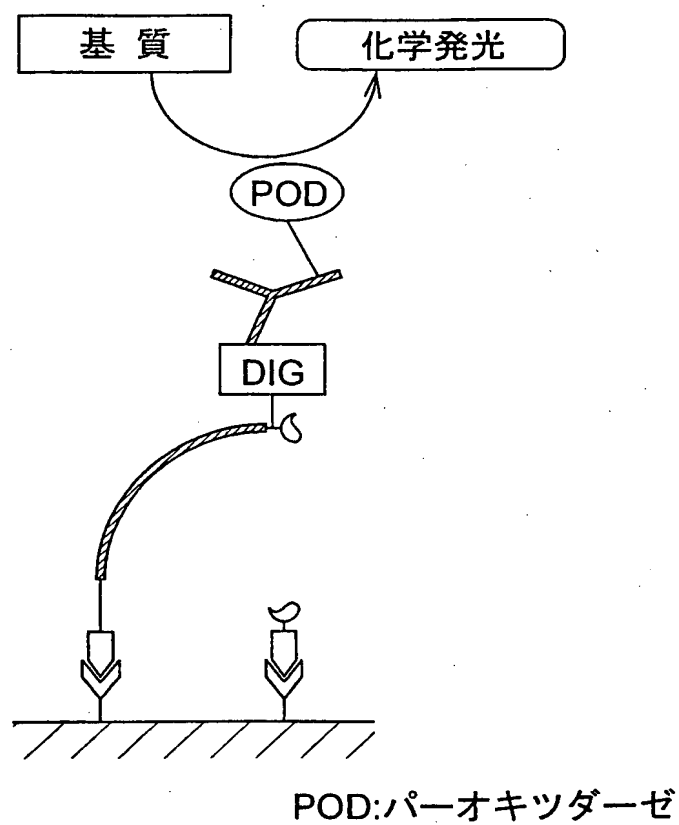


図10



AP:アルカリ フォスファターゼ

図11



## 配列表

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt;Laboratory of Molecular Biophotonics

5       <120>Probes for detecting a target nucleic acid, methods for detecting a target nucleic acid, and a solid material for detecting a target nucleic acid and method for preparing the same

&lt;130&gt;BBP98-03PCT

10

&lt;160&gt;20

&lt;210&gt;1

&lt;211&gt;20

15

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;a probe, 5'-terminal:Biotin

20

&lt;400&gt;1

GGTGGCGGCC GCTCTAGAAC 20

&lt;210&gt;2

25

&lt;211&gt;23

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Artificial Sequence

&lt;220&gt;

30

&lt;223&gt;a probe, 5'-terminal:Biotin, N:Disulfide bond

&lt;400&gt;2

TTNGGTGGCG GCCGCTCTAG AAC 23

35

&lt;210&gt;3

&lt;211&gt;26

&lt;212&gt;DNA

&lt;213&gt;Artificial Sequence

40

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;a probe, 5'-terminal:Biotin, N:Disulfide bond

&lt;400&gt;3

TTTTTNGGTG GCGGCCGCTC TAGAAC 26

45

<210>4  
<211>31  
<212>DNA  
<213>Artificial Sequence  
5  
<220>  
<223>a probe, 5'-terminal:Biotin, N:Disulfide bond  
  
<400>4  
10 TTTTTTTTTT NGGTGGCGGC CGCTCTAGAA C 31  
  
<210>5  
<211>20  
<212>DNA  
15 <213>Artificial Sequence  
  
<220>  
<223>a probe, 5'-terminal:Phosphorylated, 3'-terminal:Biotin  
  
<400>5  
20 TAGTGGATCC CCCGGGCTGC 20  
  
<210>6  
<211>40  
25 <212>DNA  
<213>Artificial Sequence  
  
<220>  
<223>a target  
30  
  
<400>6  
GCAGCCCGGG GGATCCACTA GTTCTAGAGC GGCCGCCACC 40  
  
<210>7  
35 <211>22  
<212>DNA  
<213>Artificial Sequence  
  
<220>  
40 <223>a probe, 5'-terminal:Biotin, N1:Disulfide bond, N2:BODIPY493/503  
  
<400>7  
NNGGTGGCGG CCGCTCTAGA AC 22  
45 <210>8

<211>41  
<212>DNA  
<213>Artificial Sequence

5 <220>  
<223>a target

<400>8  
GCAGCCCCGGG GGATCCACTA AGTTCTAGAG CGGCCGCCAC C 41

10 <210>9  
<211>39  
<212>DNA  
<213>Artificial Sequence

15 <220>  
<223>a target

<400>9  
20 GCAGCCCCGGG GGATCCACTG TTCTAGAGCG GCCGCCACC 39

<210>10  
<211>23  
<212>DNA  
25 <213>Artificial Sequence

<220>  
<223>a probe,5'-terminal:Biotin, N:Digoxigenin

30 <400>10  
TTNGGTGGCG GCCGCTCTAG AAC 23

<210>11  
<211>24  
35 <212>DNA  
<213>Artificial Sequence

<220>  
<223>a probe,5'-terminal:Biotin, N1:Disulfide bond, N2:Digoxigenin

40 <400>11  
TTNNGGTGGC GGCCGCTCTA GAAC 24

<210>12  
45 <211>22

<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

5 <220>  
<223> a probe, 5'-terminal:Biotin, N1:Disulfide bond, N2:Digoxigenin

<400> 12  
NNGGTGGCGG CCGCTCTAGA AC 22

10 <210> 13  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

15 <220>  
<223> a probe, 5'-terminal:Biotin, N1:Disulfide bond, N2:Digoxigenin

<400> 13  
TTTTTNNGGT GGCGGCCGCT CTAGAAC 27

20 <210> 14  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

25 <220>  
<223> a probe, 5'-terminal:Biotin, N1:Disulfide bond, N2:Digoxigenin

<400> 14  
30 TTTTTTTTTT NNGGTGGCGG CCGCTCTAGA AC 32

<210> 15  
<211> 24  
<212> DNA  
35 <213> Artificial Sequence

<220>  
<223> a probe, 5'-terminal:Biotin, N1:Disulfide bond, N2:Rhodamine Red

40 <400> 15  
TTNNGGTGGC GGCCGCTCTA GAAC 24

<210> 16  
<211> 24  
45 <212> DNA



<213>Artificial Sequence

<220>

<223>a probe,5'-terminal:Biotin, N1:Disulfide bond, N2:TEXAS Red

5

<400>16

TTNNGGTGGC GGCCGCTCTA GAAC 24

10

<210>17

<211>26

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

15

<220>

<223>a probe,5'-terminal:Biotin, N1-5:Deoxyuridine, N6:Digoxigenin

<400>17

NNNNNNGGTG GCGGCCGCTC TAGAAC 26

20

<210>18

<211>40

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

25

<220>

<223>a target

<400>18

GGTGGCGGCC GCTCTAGAAC TAGTGGATCC CCCGGGCTGC 40

30

<210>19

<211>100

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

35

<220>

<223>a target

<400>19

CGGTATCGAT AAGCTTGATA TCGAATTCCT GCAGCCCGGG GGATCCACTA GTTCTAGAGC 60  
GGCCGCCACC GCGGTGGAGC TCCAATTCGC CCTATAGTGA 100

40

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP99/00041

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>6</sup> C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>6</sup> C12Q1/68		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 93/04199, A2 (Scientific Generics Ltd.), 4 March, 1993 (04. 03. 93) (Family: none)	1-18
PA	WO, 98/31836, A1 (Hyseq Inc.), 23 July, 1998 (23. 07. 98) & AU, 9831836, A	1-18
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 22 April, 1999 (22. 04. 99)		Date of mailing of the international search report 11 May, 1999 (11. 05. 99)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> C12Q1/68

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG)

BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 93/04199, A2 (Scientific Generics Ltd.) 4. 3月. 1993 (04. 03. 93) (ファミリーなし)	1 - 18
PA	WO, 98/31836, A1 (Hyseq Inc.) 23. 7月. 1998 (23. 07. 98) & AU, 9831836, A	1 - 18

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22. 04. 99

国際調査報告の発送日

11 / 05 / 99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

深草 亜子



4 B

9548

電話番号 03-3581-1101 内線 6281